

Tesis de Posgrado

Caracterización de las membranas que forman el aparato fotosintético de *Rhodospseudomonas viridis* y purificación y caracterización de su centro de reacción

Pucheu, Norma Lucrecia

1977

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Pucheu, Norma Lucrecia. (1977). Caracterización de las membranas que forman el aparato fotosintético de *Rhodospseudomonas viridis* y purificación y caracterización de su centro de reacción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1574_Pucheu.pdf

Cita tipo Chicago:

Pucheu, Norma Lucrecia. "Caracterización de las membranas que forman el aparato fotosintético de *Rhodospseudomonas viridis* y purificación y caracterización de su centro de reacción". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1977. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1574_Pucheu.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Caracterización de las membranas que forman el aparato fotosintético de Rhodospseudomonas viridis y purificación y caracterización de su centro de reacción.

Autor: NORMA LUCRECIA PUCHEU

Director: Dr. AUGUSTO FERNANDO GARCIA

1574

REC 12 1574
12

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
EN LA ORIENTACION QUIMICA BIOLOGICA

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Augusto F. García, porque con gran sentido de responsabilidad y con profunda calidez humana supo transmitirme los conocimientos, el apoyo y el entusiasmo necesarios para que esta investigación pudiera llevarse a cabo, y además porque siempre encontré en él a un verdadero e incondicional amigo.

A mi querida amiga Norma L. Kerber, por su colaboración en este trabajo y en todo momento desde el comienzo de nuestra amistad.

A la Fundación Bariloche por haberme posibilitado la realización de gran parte de este trabajo y a todos los miembros del Departamento de Biología por su constante apoyo y estímulo.

Al Dr. Pedro Cattáneo, por haber realizado la determinación de ácidos grasos.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas quien a través de subsidios otorgados al Dr. Augusto F. García, financió en parte la realización de este trabajo.

Al Comodoro Egar A. Kerber, por su tan gentil colaboración en la impresión de la versión final de este trabajo.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para que esta investigación pudiera realizarse.

DEDICADA:

A mis padres, por todo el amor, la comprensión y la firmeza con que me educaron, brindándome siempre un ejemplo de valor y honestidad.

INDICE

	Página
Abreviaturas empleadas	1
INTRODUCCION	
1.- Generalidades	3
a.- Clorofilas. El pigmento esencial de la fotosíntesis.	5
b.- La absorción de la luz.	5
2.- Primeras observaciones sobre la reacción primaria de la fotosíntesis. El donador primario de electrones.	8
3.- Naturaleza del centro de reacción.	10
a.- Dicroísmo circular.	13
b.- Fluorescencia.	17
c.- Estados triplete y la fosforescencia.	20
d.- Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica	23
4.- Composición proteica del centro de reacción.	31
5.- Rendimiento cuántico de la fotooxidación del P870.	32
6.- Cinética de la fotooxidación del P870.	33
7.- Mecanismo de la fotooxidación del P870. Estados de transición a bajos potenciales rédox.	34

	Página
8.- El aceptor primario de electrones.	40
a.- Generalidades.	40
b.- Tamaño del pool de aceptores primarios.	41
c.- Titulaciones rédox del aceptor primario de electrones.	43
d.- Evidencias que postulan al Fe como aceptor primario.	45
e.- Evidencias que postulan a la ubiquinona como aceptor primario.	46
GENERALIDADES SOBRE BACTERIAS FOTOSINTETICAS	50
OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION	54
MATERIALES Y METODOS	
1.- Medios de cultivo para <u>Rps. viridis</u> .	58
a.- Medio de Hutner.	58
b.- Medio de Hutner con leucina.	60
c.- Medio líquido sintético con malato.	60
d.- Medio sólido.	61
2.- Crecimiento de <u>Rps. viridis</u> .	62
3.- Cosecha de las células y preparación de los cromatóforos.	63
4.- Obtención de fracciones subcromatofóricas.	64

	Página
5.- Purificación del centro de reacción.	64
a.- Procedimiento A, utilizando SDS.	66
b.- Procedimiento B, utilizando LDAO.	68
c.- Procedimiento C, utilizando LDAO.	72
6.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.	74
a.- Preparación de los geles.	76
b.- Preparación de la muestra.	77
c.- Condiciones de la corrida electroforética.	78
d.- Tinción y destinción de los geles	78
e.- Registro espectrofotométrico de los geles.	79
f.- Determinación del peso molecular de las sub- unidades del centro de reacción.	79
g.- Electroforesis en gel de poliacilamida como criterio de pureza.	80
7.- Determinación del peso molecular del complejo por filtración en gel.	84
a.- Sepharosa 6B.	84
b.- Bio gel P300.	85
8.- Cromatografía en capa delgada.	87
a.- Determinación de lípidos.	87
b.- Determinación de quinonas.	89
c.- Determinación de la composición de pigmentos.	90

	Página
9.- Cromatografía en papel.	91
10.- Determinación de ácidos grasos.	92
11.- Determinación de ornitina.	93
12.- Determinación de fósforo inorgánico.	93
13.- Determinación de bacterioclorofila.	93
14.- Determinación de proteínas.	96
15.- Determinación de radioactividad.	97

RESULTADOS

A.- Algunos factores que influncian el estado de las membranas de <u>Rps. viridis</u> in vitro.	98
1.- Centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa.	98
a.- Efecto sobre PMC.	98
b.- Efecto sobre PMC, lavada con PBS 10 mM pH 7.2.	100
2.- Corto tiempo de centrifugación en gradientes discontinuos de sacarosa.	102
a.- Efecto sobre PMC, dializada contra PBS.	102
b.- Efecto sobre PMC, lavada con PBS.	104
c.- Efecto sobre PMC, dializada contra agua destilada.	104
d.- Efecto sobre PMC, lavada con Tris-Mg ²⁺ .	107

	Página
e.- Efecto sobre PMC, dializada contra Tris-Mg ²⁺ .	107
f.- Efecto del lavado de PMC con proteínas puras.	110
B.- Estudios comparativos hechos sobre membranas de <u>Rps. viridis</u> crecidas en presencia y en ausencia de extracto de levadura.	113
1.- Crecimiento de las células sin extracto de levadura.	113
2.- Repigmentación de las células con p-ABA, ácido fólico y fracciones del extracto de levadura.	116
3.- Centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa, de ambos tipos de membrana.	119
4.- Composición proteica de ambas membranas.	121
5.- Composición de lípidos y ácidos grasos de ambos tipos de membrana.	123
6.- Espectro de absorción de ambas membranas.	129
7.- Purificación de complejos Bchl-proteína de ambos tipos de membrana.	129
C.- Purificación y caracterización del centro de reacción aislado de membranas de <u>Rps. viridis</u> .	135
1.- Purificación del centro de reacción.	135
a.- Empleando un detergente iónico, SDS.	135
b.- Empleando un detergente no-iónico, LDAO.	137

	Página
2.- Composición proteica del centro de reacción.	150
a.- Centro de reacción obtenido por el procedimiento A.	150
b.- Determinación del peso molecular de las subunidades del CR bajo diferentes condiciones disociantes.	152
3.- Actividad fotoquímica del centro de reacción.	156
4.- Determinación de la estequiometría de las subunidades del centro de reacción.	160
5.- Determinación del peso molecular del complejo por filtración en gel.	162
6.- Presencia de citocromos en el centro de reacción.	163
7.- Presencia de quinonas en el centro de reacción.	164
DISCUSION Y CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFIA	181

ABREVIATURAS EMPLEADAS

Bchl: bacterioclorofila
Bis-acrilamida: N N' metilen bisacrilamida
Bpheo: bacteriofeofitina
BSA: albúmina de suero bovino
CD: dicroismo circular
Chl: clorofila
CR: centro de reacción
DEAE-celulosa: dietil aminoetil celulosa
DNP-alanina: dinitrofenil alanina
EDTA: ácido etilendiamino tetraacético
ENDOR: doble resonancia nuclear electrónica
EPR: resonancia paramagnética electrónica
LDAO: óxido de lauril dimetilamino
mA: miliamperes
ME: β -mercaptoetanol
mseg: mili segundos
 μ seg: micro segundos
NTA: ácido nitrolotriacético
OD: densidad óptica
ORD: dispersión óptica rotatoria
p-ABA: ácido para amino benzoico
PBS: buffer fosfato de sodio
PM: peso molecular
PMC: preparación de membrana cruda

PML: preparación de membrana lavada
pseg: pico segundos
Q: ubiquinona
SDS: dodecil sulfato de sodio
TEMED: N,N,N',N', tetrametiletilendiamina
Tris: tris-hidroximetil aminometano
TX100: Tritón X 100
w/v: peso/volumen

INTRODUCCION

1.- Generalidades

La fotosíntesis bacteriana comienza con la absorción de la luz por un conjunto de moléculas de bacterioclorofila (Bchl) que se llama "cosechadora de luz" ó "antena". La energía migra rápidamente a través de la Bchl antena hasta que alcanza un sitio especializado, donde ocurre la reacción primaria de la transferencia de electrones.

El sitio especializado, mencionado antes, es un complejo de pigmento y proteína unido a la membrana, que se conoce como el "centro de reacción fotosintético": CR.

La figura 1 muestra un esquema de la unidad fotosintética.

La Bchl antena y los carotenoides absorben la energía radiante y la transfieren al centro de reacción que es donde ocurre la transformación fotoquímica.

La migración de energía hacia el centro de reacción y su subsecuente captura, en una reacción de transferencia de electrones, son extremadamente eficientes.

En muchas especies, por lo menos el 90% de los fotones que son absorbidos van a tener como efecto una transferencia de

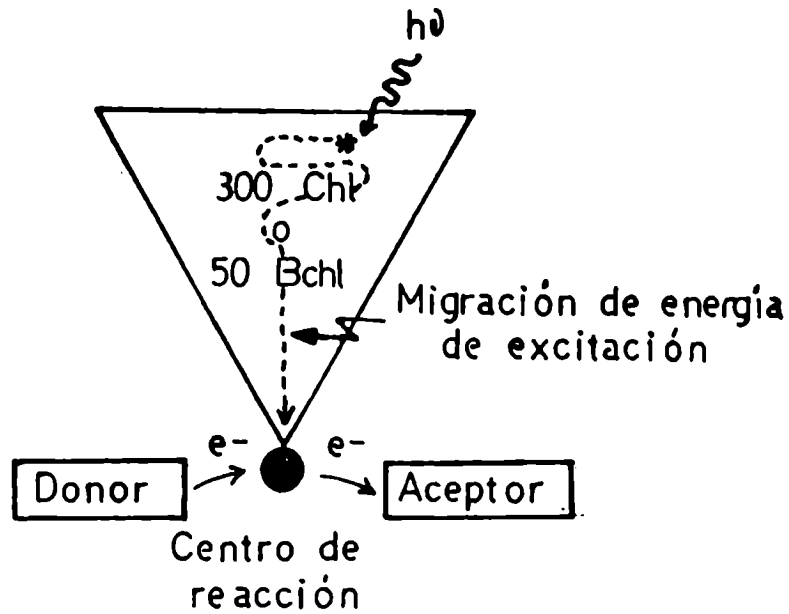


Figura 1:

Representación esquemática de una unidad fotosintética y su centro de reacción asociado. Un cuanto de energía de excitación $h\nu$, absorbido por la Bchl antena migra hacia el centro de reacción donde ocurre la separación de entidades oxidantes y reductoras.

electrones; disipándose como fluorescencia menos el 5% de dicha energía.

a.- Las clorofilas. El pigmento esencial de la fotosíntesis.

Las clorofilas son el pigmento central que absorbe la luz en la fotosíntesis, es la clorofila a en plantas y algas y bacterio-clorofila a y b en bacterias fotosintéticas. No se conoce ningún organismo que lleve a cabo fotosíntesis y que no posea uno u otro de estos pigmentos esenciales excepto el caso de las Halobacterias donde ocurre un tipo especial de fotosíntesis. Además existen algunos pigmentos accesorios que absorben la luz y posibilitan que la excitación resultante sea útil para las reacciones fotosintéticas a la luz.

Los pigmentos accesorios más conocidos son: carotenoides, xantofilas, ficobilinas, etc.

b.- La absorción de la luz.

La conversión fotosintética de energía se inicia por la absorción de la luz por las clorofilas ó por algunos de los pigmentos accesorios. Para entender la naturaleza de este proceso, es necesario examinar algunos aspectos importantes de la absorción de fotones por las moléculas. Las clorofilas tienen propiedades que resultan útiles para ilustrar los principios generales de la absorción de fotones.

La absorción o captura de un fotón incidente por una molécula, conduce a una redistribución de sus electrones dentro de su estructura molecular. La molécula adquiere así un nuevo estado que se conoce como "estado electrónico excitado" y su energía es mayor que la del estado inicial ó "estado base". La energía extra viene de los fotones absorbidos y es gobernada por la ecuación de Planck.

$$\Delta E = E_1 - E_0 = h\nu = hc/\lambda$$

donde ν es la frecuencia de la radiación absorbida, λ es su longitud de onda, h es la constante de proporcionalidad de Planck, c es la velocidad de la luz, y E_1 y E_0 , son las energías de la molécula en el estado excitado final y en el estado base inicial respectivamente.

El proceso de absorción se puede describir por la ecuación



Existen un conjunto de estados electrónicos excitados cada uno con su energía y distribución de electrones característica. Una molécula absorbe la radiación incidente sólo si tiene la energía correcta para que ocurra la transición desde el estado base de la molécula a algún estado excitado "permitido". Los fotones con energías intermedias no producen ninguna activación en las moléculas de clorofila.

El espectro de absorción que se determina experimentalmente, es una gráfica de la probabilidad de la absorción de la radiación

en función de la energía de la radiación, habitualmente se grafica en función de la longitud de onda de la radiación.

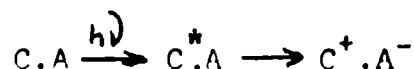
Para moléculas del tipo de las clorofilas los niveles de energía son bastante amplios debido a la posibilidad de excitación tanto de las vibraciones moleculares como de los electrones.

El espectro de absorción electrónico de las clorofilas consiste en un conjunto de bandas bien definidas que se extiende a través de las regiones UV y visible del espectro terminando con longitudes de onda (de baja energía) entre 600 y 1000 nm en la zona del rojo o infrarrojo cercano. Las bandas de absorción electrónica de las clorofilas son bastante intensas, lo que indica que las transiciones de los estados base a los estados excitados son muy permitidas en presencia de un flujo de fotones, una solución conteniendo 10^{-5} moles/litro de clorofila es intensamente coloreada, esta absorción intensa es de gran valor en producir una captura muy eficiente de fotones para la fotosíntesis.

Una propiedad importante de una banda de absorción es su energía característica, ΔE (longitud de onda λ ó frecuencia ν) en el máximo de absorción. Estas cantidades están relacionadas por la ecuación de Planck. En el caso de la clorofila a la transición de menor energía ó de mayor longitud de onda ocurre cerca de 660 nm, la energía correspondiente es de 1.9 eV/molécula ó 43 Kcal/mol. Energías de esta magnitud son equivalentes a las requeridas para disociar una unión covalente débil, sin embargo con las clorofilas no ocurre ninguna disociación a esta longitud

de onda. Los procesos de excitación resultan solamente en un cambio en la distribución electrónica dentro de la estructura molecular.

Generalmente, la redistribución de la densidad electrónica está limitada principalmente a unos pocos electrones lábiles. En las clorofilas éstos son los electrones π del sistema de anillos porfirínicos conjugados. Estos electrones están más debilmente unidos en la molécula excitada (C^*) y en presencia de una molécula asociada A, con una fuerte afinidad por los electrones (aceptor de electrones), un electrón de la molécula excitada se transfiere a A, resultando en una separación de cargas (obtención de un par de iones).



2.- Primeras observaciones sobre la reacción primaria de la fotosíntesis. El donador primario de electrones.

Duysens (1) fue el primero en obtener evidencias experimentales sobre la participación directa de la Bchl ó Chl en el acto primario de la fotosíntesis. Observó cambios reversibles (2,3) fotoinducidos en una pequeña porción (aproximadamente 2-5%) del espectro de absorción de la Bchl en cromatóforos ó células intactas, por ejemplo, luego de iluminar cromatóforos de C.vinosum detectó pequeños cambios de absorbancia en el IR cercano, estos

cambios incluían una disminución (bleaching) en la banda de absorción a 870 nm y un corrimiento hacia el azul (blue shift) en la banda a 800 nm.

Más tarde (4,5) se observaron cambios de absorbancia similares producidos por oxidaciones químicas suaves.

Fue Clayton quien desarrolló la idea de que esos cambios de absorbancia reflejaban la oxidación de un componente de Bchl reactiva especial que representaba entre 2-5% del total de la Bchl presente (6,7). Esta fotooxidación ocurre reversiblemente con un rendimiento cuántico relativamente alto aún a 1°K (8,9).

Significativamente, una cepa mutante de Rps. spheroides, que resultó ser no fotosintética, se encontró que carecía de Bchl reactiva (10).

Parson en 1968 (11) encontró que cuando exponía cromatóforos de C. vinosum a un corto flash de luz (30 nseg.), la fotooxidación total de la Bchl reactiva ocurría en menos de 0.5 useg. con un rendimiento cuántico cercano a 1. Luego esa Bchl oxidada extrae un electrón de un citocromo de tipo c, esta segunda reacción ocurre en un tiempo medio de 2 u segundos y también con un rendimiento cuántico cercano a 1.

Al complejo Bchl reactivo se lo llama generalmente "P870" donde P significa pigmento y 870 indica la longitud de onda máxima de su principal banda de absorción en el IR. La posición real de la banda de absorción varía en ± 15 nm entre las diferentes especies de bacterias que contienen Bchl a y bastante más si se tie-

ne en cuenta las que contienen Bchl b. Muchos autores sin embargo usan la designación "P" con diferentes subcriptos para indicar la real longitud de onda máxima dependiendo de las especies. El uso de "P870" como un término general es más simple y resulta adecuado porque las propiedades básicas del complejo no varían fundamentalmente.

Existe un amplio rango de evidencias que proveen un fuerte apoyo a la propuesta de que la Bchl ó clorofila en un medio ambiente especial (P870) es el donador primario de electrones asociado con las reacciones fotosintéticas a la luz.

Una condición importante de este medioambiente especializado es la proximidad de un aceptor de electrones adecuado.

3.- Naturaleza del centro de reacción.

El conocimiento de la naturaleza del P870 ha tomado considerable incremento en los últimos años. En este aspecto han tenido mucha importancia los trabajos de Reed y Clayton en 1968 (12) sobre la purificación de una preparación de centro de reacción libre de Bchl antena.

Los primeros estudios en este campo, involucraron foto-oxidaciones selectivas y oxidaciones químicas de la Bchl antena. Reed y Clayton utilizando Triton X 100 y trabajando con una mutante libre de carotenoides de Rps. spheroides (R26), obtuvieron una partícula con un PM aproximado de 6.5×10^5 D que contenía P870; ubi-

quinona (Q); citocromos de tipo b y c y hierro y cobre no hémicos (12). Trabajos posteriores de Reed, Clayton, Feher y sus colaboradores (13-17) condujeron al aislamiento de preparaciones más simples y más puras de la misma cepa (R26), estas partículas tienen un PM: 7×10^4 D., las preparaciones más puras contienen un equivalente de Q y uno de hierro no hémico por mol de P870 y están libres de citocromos, cobre y Bchl antena. Algunos de estos investigadores usaron un detergente no iónico LDAO, óxido de lauril dimetilamino para separar las subunidades de la membrana, es decir para el aislamiento del CR.

La referencia (18) incluye una puesta al día de las preparaciones que se han obtenido hasta el momento.

La figura 2 muestra el espectro de absorción de una preparación de centro de reacción de Rps. spheroides (R26). Luego de iluminar, la banda de absorción a 865 nm, desaparece casi completamente y las bandas a 800 nm y 370 nm, sufren un pequeño corrimiento hacia el azul, la banda a 600 nm disminuye algo y se corre hacia el azul, también aparecen nuevas bandas de absorción a 425 nm y 1260 nm.

Las fotooxidaciones del P870 en las preparaciones de CR puede ser puesta de manifiesto por la exposición de la muestra, a un muy corto flash de luz, tanto como a iluminación continúa. Tanto en un caso como en el otro, el proceso es totalmente reversible. Si bien el P870⁺ generalmente requiere 0,1 - 1 segundo para retornar a su estado reducido, una vez eliminada la fuente

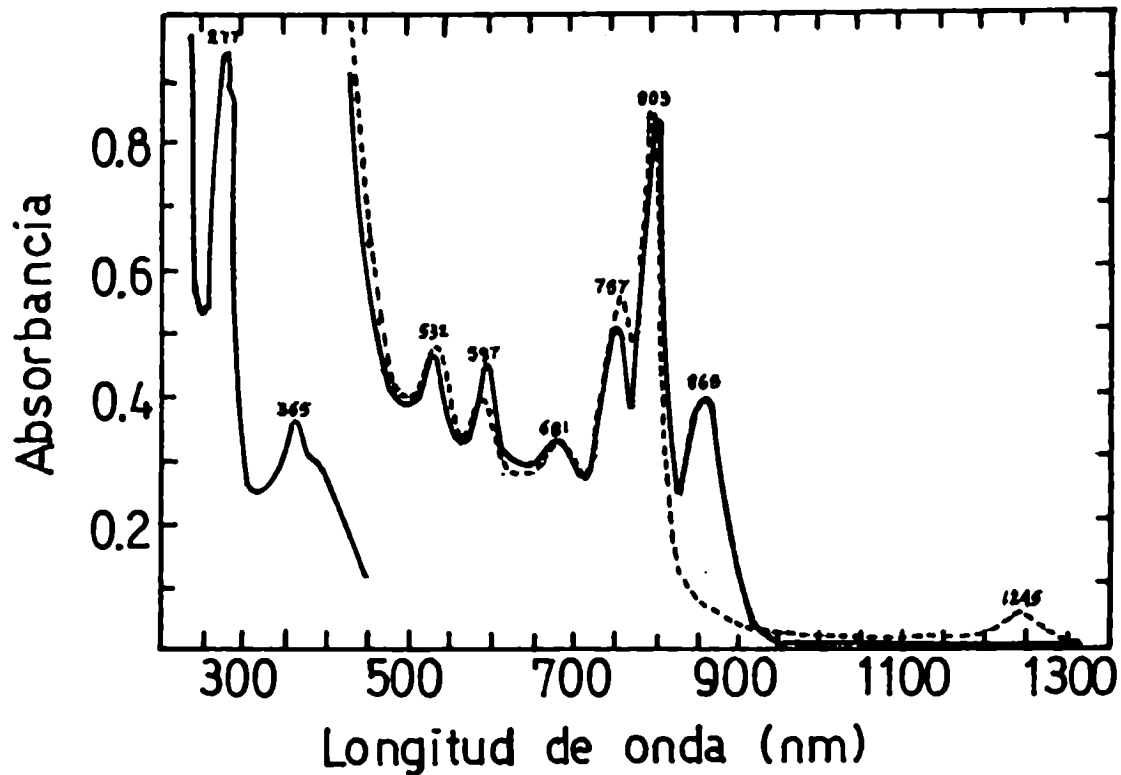


Figura 2:

Espectro de absorción del centro de reacción de *Rps. spheroides*, R26 (—) en oscuridad; (----) bajo iluminación continua con luz de 800 nm. Esta figura está tomada de la referencia 13.

de luz, si se agrega citocromo de tipo c reducido a la preparación; el retorno del P870⁺ a su estado reducido es mucho más rápido: requiriendo solamente 1 m segundo y el citocromo se oxida al mismo tiempo que el P870⁺ se reduce (19-21).

Si se posee información analítica sobre el contenido de pigmentos de una muestra con una absorbancia dada, entonces conociendo los coeficientes de extinción es posible calcular el número de moléculas de pigmento en cada CR. Los resultados de cálculos y medidas de este tipo indican que cada complejo P870 contiene 4 moléculas de Bpheo (bacteriofeofitina) (17;20).

En la Bpheo: el Mg^{++} central de la Bchl está reemplazado por 2 protones.

En la figura 2 algunas de las bandas de absorción son debidas a la Bpheo (535; 760 nm) otras (600; 800 y 865 nm) corresponden a la Bchl y la de 370 nm a ambas.

En realidad no tiene demasiado sentido subdividir las bandas de absorción ya que los miembros del complejo interactúan muy fuertemente, consecuentemente las bandas de absorción son propiedades del complejo como un todo, más que de sus componentes individuales.

A continuación se describen algunos métodos corrientemente utilizados para dilucidar la estructura y la función del P870.

a.- Dicroísmo circular.

Existen evidencias que indican fuertes interacciones entre

las moléculas de Bchl y Bpheo del CR y se obtienen de los estudios sobre espectros de dicroísmo circular (CD) (22-26).

Moléculas como las clorofilas, que son asimétricas; y por lo tanto no superponibles con su imagen especular poseen una propiedad conocida con el nombre de "quiralidad". Esta propiedad distingue moléculas que rotan el plano de la luz polarizada hacia la derecha de las que lo rotan hacia la izquierda.

Un haz de luz linealmente polarizada de longitud de onda λ , puede ser considerado como la suma de 2 componentes, un haz de luz circularmente polarizado hacia la derecha y uno circularmente polarizado hacia la izquierda, con vectores eléctricos E_D y E_I respectivamente.

Cuando una luz con esas características interactúa con una molécula asimétrica se observan dos fenómenos, el dicroísmo circular (CD) y la dispersión óptica rotatoria (ORD) y la molécula se dice que es ópticamente activa.

Este fenómeno surge de los siguientes hechos:

- E_I y E_D se desplazan a diferentes velocidades a través de la molécula. Una diferencia en el índice de refracción conduce a una rotación óptica, es decir a la rotación del plano de polarización, medida en grados de rotación $\alpha\lambda$. ORD es la dependencia de esta rotación con la longitud de onda.

En una región donde la molécula no absorbe luz, la rotación graficada contra la longitud de onda da una curva plana. En la región donde hay absorción de luz, la rotación primero incrementa nítidamente en una dirección, cae a cero a la máxima absorción, y

luego crece nítidamente en la dirección opuesta.

A esta dispersión se llama "Efecto Cotton".

- En la región de su efecto Cotton, una molécula asimétrica que exhibe ORD también presentará una absorción desigual de la luz circularmente polarizada hacia la derecha y hacia la izquierda, esta diferencia en coeficientes de extinción ($E_I - E_D$) se conoce como dicroísmo circular, y puede ser medida directamente en algunos instrumentos como una absorbancia diferencial.

Cuando ocurre CR, el haz de luz que emerge, ya no es más linealmente polarizado, sino elípticamente polarizado (porque además de cambiar el plano de la luz polarizada, cambia la amplitud de la onda), así la elipticidad de la luz resultante θ_λ es otra medida de CD y es proporcional a ($E_I - E_D$).

El CR es pequeño comparado con la absorción. En la figura 3 se muestra el espectro de CD de la Bchl a en éter, junto con el espectro de absorción normal.

En general existen bandas de CD con cada uno de los principales componentes de absorción. Se vé como las bandas de CD pueden tener signo positivo o negativo. Esta propiedad del CD tiene la ventaja práctica de permitir descomponer o separar transiciones que se superponen fuertemente en el espectro de absorción.

Las medidas de rotación ópticas, especialmente espectros de CD provéen una buena información de un número de propiedades moleculares interesantes de las clorofilas que son:

- Determinación de las configuraciones absolutas de átomos de C asimétricos de clorofilas aisladas.

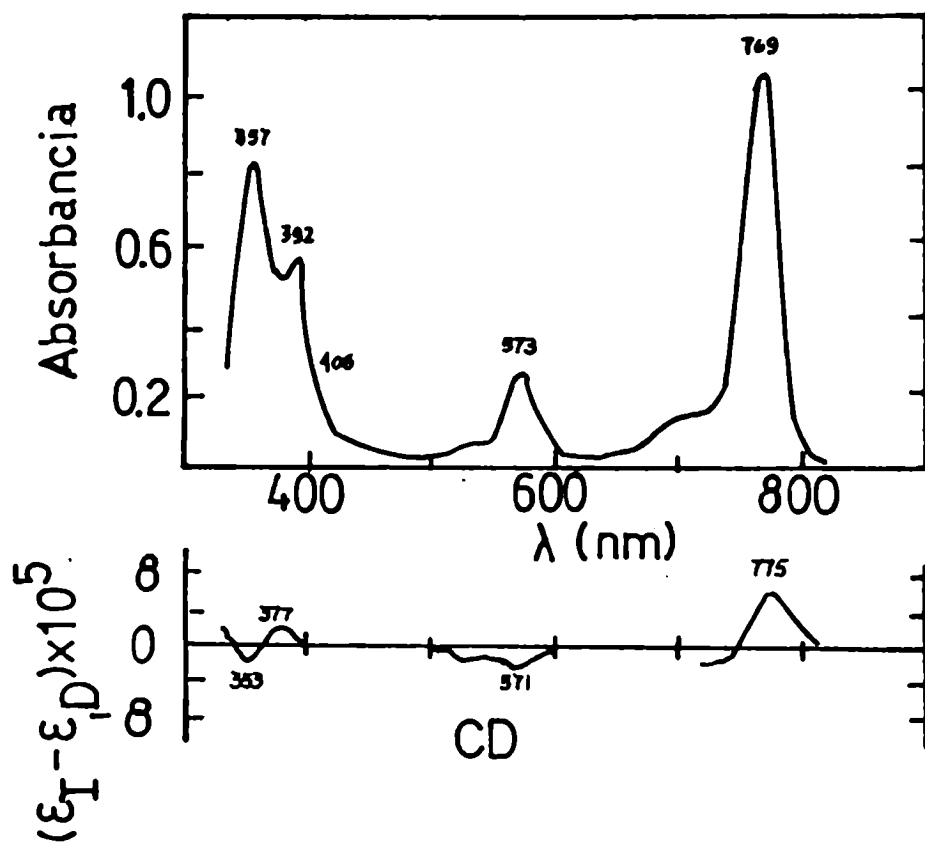


Figura 3:
 Espectro de absorción y de CD de Bchl a en éter etílico a una concentración de 10^{-5} moles/litro. En este solvente y a esta concentración la Bchl a es monomérica. Los espectros son tomados de la referencia 24.

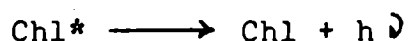
- Caracterización de la geometría de las clorofilas, en dímeros y grandes agregados.
- Evidencias sobre la presencia, número y estructuras de clorofilas asociadas en lamelas fotosintéticas, e información sobre los cambios de su interacción después de una activación por la luz.
- Evidencias sobre las interacciones de medioambientes asimétricos, tales como la matriz proteica de los complejos de clorofilas presentes en la membrana.

Un hecho crítico que se observa en los espectros de CD del P870 es la presencia de 2 bandas de signo opuesto a una determinada longitud de onda (600 nm y 800 nm). Esto significa que las bandas de absorción a esas longitudes de onda deben inducir por lo menos 2 transiciones electrónicas con CD opuesto.

Resultados de este tipo es lo que se podría esperar de una asimetría que surge de la interacción de cromóforos vecinos que están asimétricamente colocados unos respecto de otros, esto conduce a CD degenerado ó "exitón", que se caracteriza precisamente por tener múltiples componentes para cada banda de absorción electrónica (27).

b.- Fluorescencia

La fluorescencia es el proceso por el cual una molécula en un estado excitado sufre una desactivación espontánea y retorna al estado base con una emisión simultánea de radiación. Este proceso se puede representar por la ecuación :



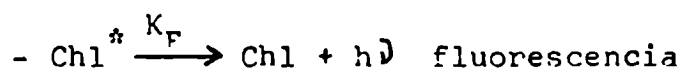
La fluorescencia de la Chl a es típica de grandes moléculas aromáticas en los siguientes aspectos:

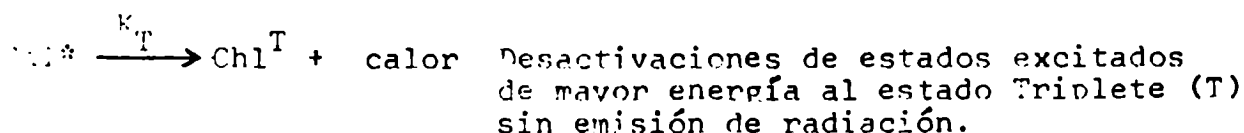
- La fluorescencia ocurre sólo desde el estado excitado más bajo, alcanzado por absorción. Los estados más altos, sufren una muy rápida relajación al estado excitado más bajo sin emisión de radiación.
- Debido a que la relajación térmica, ocurre en los estados excitados antes de la emisión, y en el estado base después de la emisión, el máximo en el espectro de emisión de fluorescencia, siempre aparece unos pocos nm hacia mayores longitudes de onda (menor energía) con respecto al máximo de absorción. Esto es conocido como "corrimiento de Stokes".
- La vida media de la fluorescencia, τ , de Chl a en algunos solventes es muy corta, cerca de 5×10^{-9} seg (28).

Cada una de estas 3 propiedades pueden ofrecer informaciones útiles sobre los estados excitados y sobre los procesos de desexcitación.

La fluorescencia no es la única forma por la cual una molécula en un estado excitado puede desactivarse.

Existen varios otros procesos que compiten con la fluorescencia y que se indican por las siguientes ecuaciones:





Todas estas reacciones son cinéticamente de primer orden con respecto a la concentración de Chl^* .

El tiempo de vida media de la Chl^* se determina por las constantes de velocidad de todas las reacciones involucradas. Una forma de tratar esto es en términos de rendimiento cuántico.

El rendimiento cuántico de la fluorescencia ϕ_F está dado por el cociente entre la velocidad de fluorescencia K_F y la suma de las velocidades de todos los procesos de desactivación.

Cuando los procesos son todos de primer orden, la concentración de Chl^* se simplifica y resulta:

$$\phi_F = \frac{K_F}{K_F + K_I + K_T + \dots} \quad (A)$$

La constante K_F se considera una propiedad intrínseca de la molécula.

La inversa de K_F es conocida como tiempo de vida media natural de los estados excitados; τ_0

$$\tau_0 = 1 / K_F$$

τ_0 es la vida media que podría tener un estado excitado, cuando no hay ningún proceso de desactivación que compita con la fluorescencia.

La inversa del denominador de la ecuación (A) es el tiempo de vida media real observado: τ .

Entonces el rendimiento de la fluorescencia se puede escribir como:

$$\phi_F = \frac{\tau}{\tau_0}$$

Teniendo en cuenta valores de rendimiento de fluorescencia del 30% y valores de τ de 5×10^{-9} seg para Chl a en solución, el τ_0 para Chl a sería alrededor de 15×10^{-9} seg, lo que concuerda muy bien con el valor de τ_0 (15,2 n seg) calculado por Brodie y Rabinowitch (28) de la intensidad de las bandas de absorción.

El τ siempre es menor que τ_0 cuando hay muchos procesos de desactivación compitiendo con la fluorescencia, y esta relación es útil para medir la contribución de los procesos de desactivación que compiten con la fluorescencia.

c.- Estados tripletes y la fosforescencia.

Cuando una molécula de clorofila en el estado base, absorbe radiación directamente, alcanza un estado excitado de alta energía, que se conoce como estado excitado "singlet".

El término "singlet", se refiere al hecho de que el número cuántico del spin de los electrones en este estado excitado se correlaciona completamente con el de los electrones en el estado basal, donde todos los electrones están apareados. Existen otros estados excitados adicionales muy importantes, conocidos como estados "tripletes" donde 2 de los electrones están no apareados. Los es-

tados tripletes no se producen normalmente por absorción directa de radiación por las moléculas en el estado basal, pueden ser alcanzados por desactivaciones entre los sistemas con liberación de calor, pero sin emisión de radiación.

En la figura 4 se pueden ver los diferentes procesos de desactivación que sufren las moléculas de Chl desde los estados singlet excitados.

Los estados tripletes pueden ser observados por sus espectros de emisión característicos (fosforescencia) que tienen un tiempo de vida media mucho más largo y una dependencia con la longitud de onda diferente a la de la fluorescencia.

La fosforescencia de las clorofilas es difícil de observar debido a su muy baja eficiencia cuántica, aparentemente, los tripletes se desactivan para retornar al estado basal, por intercombinaciones entre diferentes estados excitados y colisiones sin emisión de radiación.

Se han observado emisiones con tiempos de vida media del orden de 10^{-3} seg, para Chl a a 755 nm y para Chl b a 733 nm (29).

Estas longitudes de onda son mayores que las correspondientes a los máximos de fluorescencia lo que indica que los niveles de energía de los estados tripletes vacen por debajo del primer estado excitado "singlet", como consecuencia, el estado triplete con un tiempo de vida media mayor podría ser el candidato para atrapar la energía de la excitación en la fotosíntesis.

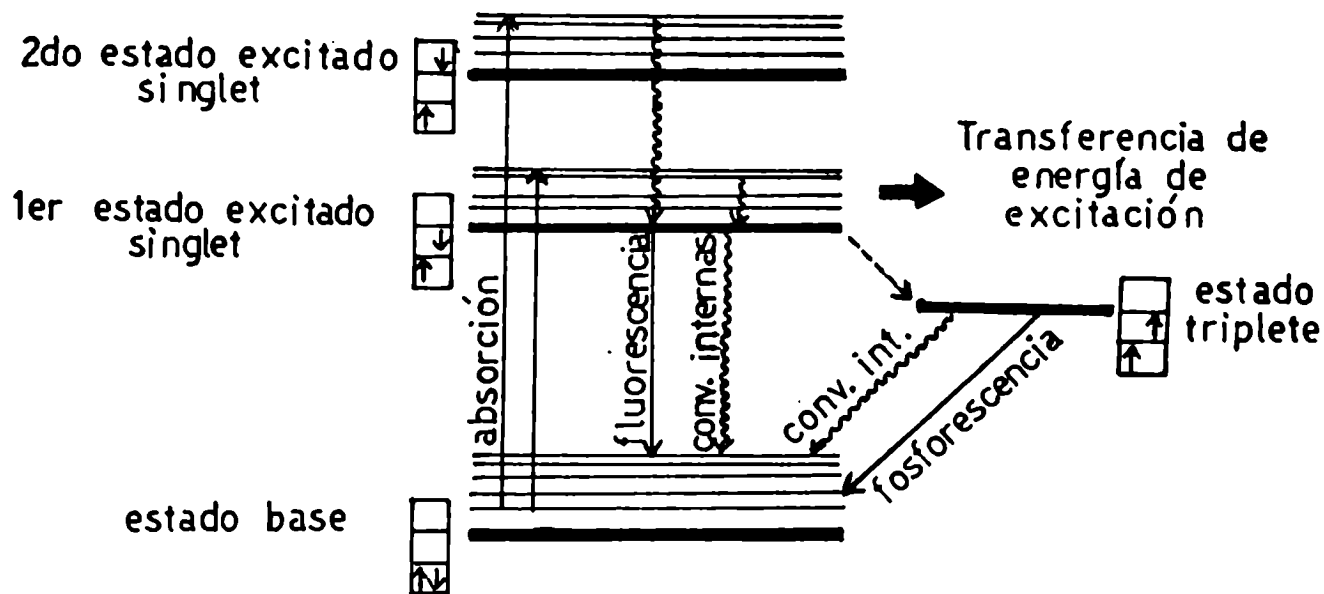


Figura 4:

Diagrama de niveles de energía y procesos de desactivación que pueden sufrir las moléculas excitadas. Las flechas pequeñas en los rectángulos indican el spin de los electrones en los diferentes niveles.

d.- Espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica.

Tanto $P870^+$ como el catión Bchl son radicales libres y bajo iluminación sufren una excitación, tal que 2 electrones, originariamente asociados en forma particular y antiparalela, se vuelven no apareados y alineados con sus spines paralelos. Para que esto sea posible, un electrón debe estar en un nivel de energía diferente del otro aunque todavía interactúen. El spin total de esta cupla de electrones puede tomar 3 diferentes orientaciones en un campo magnético aplicado, cada una con energía diferente. Tal estado molecular es, como vimos antes, llamado "estado triplete".

La técnica de EPR ofreció enormes ventajas y varios órdenes de magnitud en cuanto a sensibilidad respecto a otras técnicas y fue rápidamente aplicado al estudio del estado triplete.

La espectroscopía de resonancia paramagnética electrónica (EPR) ó resonancia de spin electrónico (ESR) se basa en el hecho de que sustancias que contienen electrones no apareados, son paramagnéticas. Este paramagnetismo puede ser debido a la presencia transitoria de sustancias oxidadas ó reducidas.

La diferencia en paramagnetismo de materiales fotosintéticos en la luz y en la oscuridad fue descubierta por Commoner en 1956 (30). En los años siguientes han aparecido numerosas especulaciones sobre el origen y el significado de resonancias inducidas por la luz en plantas y bacterias fotosintéticas

También se descubrió que la luz podría inducir un estado paramagnético en soluciones concentradas de clorofila ó en clo-

rofila cristalina y ésto pareció ser una evidencia de que el paramagnetismo estuviera asociado con la molécula de clorofila per se, y no con una función del proceso fotosintético. Actualmente sabemos que esta suposición no es verdad, ya que resonancias inducidas por la luz en organismos fotosintéticos ó en preparaciones subcelulares de ellos, han servido para estudiar eventos tempranos ó tardíos esenciales en el proceso de fotosíntesis.

Si una muestra con electrones no apareados se colocan en un campo magnético estacionario su comportamiento se puede describir como se muestra en la figura 5.

El momento magnético de un electrón puede ser representado por el dipolo μ , un vector con magnitud y dirección; la magnitud y dirección del campo magnético estacionario se representa por otro vector H_0 .

Se sabe que el momento dipolar μ ejerce un movimiento de precesión alrededor de H_0 , este movimiento de precesión del dipolo magnético se caracteriza por su velocidad angular ω y se sabe que ω es proporcional a H_0 .

$$\omega = \gamma H_0$$

donde γ es conocido como radio giromagnético. La velocidad de precesión del dipolo aumenta como aumenta la intensidad de H_0 .

Si γ se sustituye por su valor para electrones libres ($\gamma = 2.8026$) y se pone frecuencia en lugar de velocidad angular resulta:

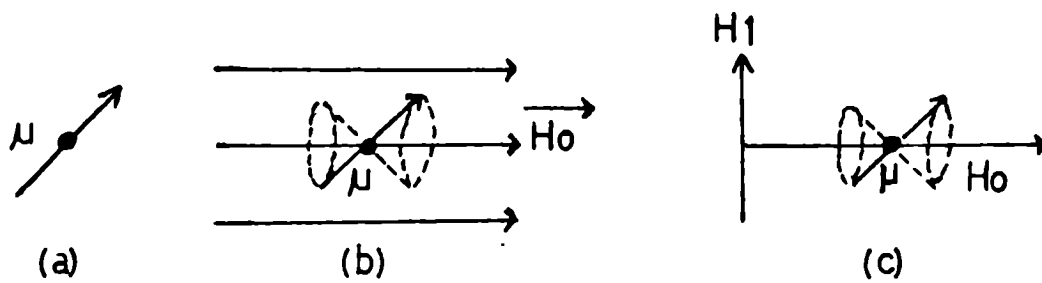


Figura 5:

Movimiento de precesión de Larmor, de un electrón en un campo magnético. (a), El momento magnético μ , asociado con un electrón aislado. (b), El movimiento precesional de μ en un campo magnético aplicado H_0 . (c), La introducción de un segundo campo magnético H_1 , oscilante y perpendicular a H_0 .

$$\gamma = (\text{megaciclos/seg}) = 2.8026 H_0 (\text{gauss})$$

Esta precesión de Larmor, como así se llama, es un proceso puramente pasivo y no nos permite detectar electrones no apareados. Pero si se pone otro campo magnético perpendicular a H_0 (H_1) se puede perturbar el movimiento de dipolo de tal forma de obtener cierto tipo de información.

Se ha encontrado que para valores muy pequeños de H_1 (o sea $H_1 \ll H_0$), si la frecuencia del campo H_1 es igual a la frecuencia de precesión del dipolo ocurre una resonancia de transferencia de energía entre la fuente de energía de H_1 y el sistema de dipolos. Ya que la configuración de menor energía de los dipolos es aquella en la que su dirección es la dirección de H_0 , se puede pensar como que absorben energía de H_1 y entonces revierte su dirección para ser opuesto a H_0 . Esta resonancia de absorción de energía, es, de hecho, observable, y su detección es la función del espectrómetro de EPR.

No se puede suministrar energía indefinidamente en la condición de resonancia, a los electrones no apareados, ya que éstos no la absorberán, pues el sistema está saturado.

Los electrones elevados a un estado energético superior no quedan allí indefinidamente ya que están acoplados magnéticamente a otros electrones cercanos de la muestra y entonces caerán a su nivel más bajo disipando su energía como energía térmica. La velocidad a la cual electrones no apareados absorberán la energía aplicada y darán así una señal observable, está limitada por la

velocidad a la cual estos electrones en el nivel superior puedan caer a su nivel original y proveer lugares en el nivel superior para ser ocupados por otros electrones.

Esta velocidad es una propiedad de la molécula individual.

También se puede considerar el fenómeno de EPR de una manera semejante a la espectroscopía convencional.

La separación de los 2 niveles de energía involucrados en la transición es:

$$\Delta E = g \beta H_0$$

donde g es el factor de separación espectroscópico (para un electrón libre vale $g = 2.00229$), β es el magnetón de Bohr y H_0 es el campo magnético.

La energía cuántica del campo es:

$$h\nu = g \beta H_0$$

Ya que g es una propiedad del electrón no apareado en su medioambiente particular, es una característica del radical libre ó sistema paramagnético observado.

Tanto $P870^+$ como el catión $Bchl^+$ que son radicales libres, exhiben transiciones EPR con $g = 2.0025 \pm 0.0001$.

Cuando se iluminan cromatóforos, preparaciones de CR ó suspensiones de células intactas siempre aparece la señal EPR con $g = 2.0025$ y desaparece paralelamente con los cambios de absorbancia ópticos originados por la oxidación del $P870$.

Los espectros EPR de $P870^+$ y del catión $Bchl^+$ difieren significativamente. El ancho de banda para la señal EPR de $Bchl^+$ es

13.0 \pm 0.2 gauss; mientras que para P870⁺ es 9.4 \pm 0.2 gauss, es decir es más angosta por un factor igual a $\sqrt{2}$.

Norris y colaboradores (31, 32) y McElroy y colaboradores (33, 34) puntualizaron que la señal EPR se hace más angosta, acercándose a la línea nítida (esperada para un electrón libre) si el spin no apareado al caer de su estado de mayor energía, lo hace sobre más de una molécula, si la delocalización ocurre sobre N moléculas, uno esperaría que la banda se hiciera más angosta por un factor de \sqrt{N} .

Esto implica que el electrón no apareado en el P870, cae expandiéndose sobre 2 moléculas de Bchl. Esta conclusión es apoyada por estudios de espectros de doble resonancia nuclear electrónica (ENDOR) del P870⁺ (35 - 37).

Los resultados expuestos se pueden resumir, diciendo que P870 está formado por un complejo de 4 moléculas de Bchl que interactúan fuertemente y 2 moléculas de bacteriofioefitina (Bphea) que interactúan con las moléculas de Bchl menos íntimamente.

Cuando el complejo pierde un electrón, dos de las moléculas de Bchl comparten el electrón no apareado que queda, y se rompen las interacciones entre las otras dos.

Katz y Norris (32) sugieren que las 2 Bchl que mantienen su interacción en P870⁺ están unidas como se ve en el esquema de la figura 6.

En este modelo, una molécula de agua actúa como 5to ligando del Mg de una de las Bchl, formando una unión H con el carbonilo y

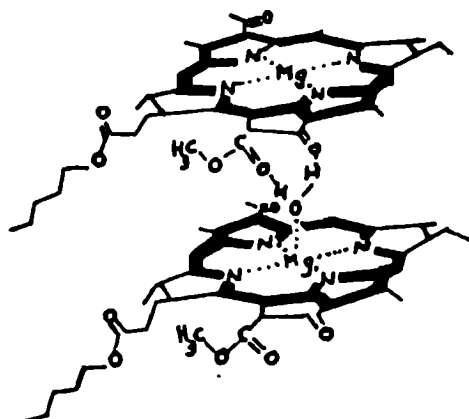


Figura 6:

Modelo de interacción entre Bchl. H_2O . Bchl, para dos de las cuatro moléculas de Bchl del P870, tomado de la referencia 32. Las dos moléculas de Bchl yacen en planos aproximadamente paralelos, con sus centros dispuestos tal que los oxígenos carboxílicos y cetónicos del anillo V en la molécula de arriba están sobre el átomo de Mg de la molécula de abajo. El átomo de la molécula de arriba, tendría también un quinto ligando que podría ser otra molécula de H_2O .

Las líneas gruesas del dibujo indican los electrones π del anillo porfirínico.

con el 0 carboxílico de la segunda Bchl. Este modelo deriva de una unidad de la estructura que Balschmitter y Katz (38) han propuesto para los grandes agregados $(Chl. H_2O)_n$ que se forman en solventes hidrocarbonados.

Siguiendo con la participación de la molécula de agua en el modelo de la figura 6 existe una evidencia circunstancial de que el agua juega un rol esencial en la fotooxidación del P870.

Clayton (39) encontró que la deshidratación de los cromatóforos de Rps. spheroides con pentóxido de fósforo bloquea la reacción fotoquímica y la rehidratación revierte el bloqueo.

Se obtienen informaciones adicionales, referentes a la orientación de los pigmentos en las membranas fotosintéticas midiendo el dicroísmo lineal (40 - 42) ó la polarización de la fluorescencia (43) y mediante experimentos de fotoselección (44). Aplicando estas técnicas a los CR, se pueden revelar las orientaciones relativas de los 6 cromóforos.

Muy recientemente Vermeghio y Clayton (45) estudiaron las orientaciones de los componentes del CR de Rps. spheroides, examinando la polarización de los cambios de absorbancia inducidos por la luz, asociados con los pigmentos del CR, en cromatóforos purificados, y estudiando los espectros de dicroísmo lineal obtenidos con cromatóforos tratados con un oxidante como cloroiridato de potasio (Cl_6IrK_2) que bloquea la Bchl antena, selectiva e irreversiblemente, dando cromatóforos con espectros de absorción de CR.

Un hecho interesante que surge de esta investigación, es la presencia de polarizaciones con signo opuesto a 790 nm y a

810 nm (incremento de abs. a 790 nm y bleaching a 810 nm), este resultado no es consistente, con la hipótesis corrientemente aceptada, de un corrimiento hacia el azul (blue shift) de la banda a 803 nm (45).

Para el shift de una banda sola, es de esperar el mismo valor de polarización a 790 nm y a 810 nm. Así proponen (45) una hipótesis alternativa: la disminución de absorbancia a 870 nm y a 810 nm son debidas al bleaching de las dos bandas en el espectro del dímero de Bchl que actúa como donador primario de electrones, el incremento a 790 nm corresponde a la aparición de una banda de Bchl monomérica, que es una propiedad de $(Bchl)_2^+$, dímero de Bchl oxidado (ver esquema en página: 48).

4.- Composición proteica del Centro de Reacción

Los polipéptidos del CR indudablemente juegan un rol muy importante en determinar la estructura del complejo proteína-pigmento.

La desnaturalización con urea 6M causa la desaparición de las bandas de absorción en 800 y 865 nm y la aparición, en su reemplazo, de una banda en 760 nm cercana a la posición esperada para la Bchl monomérica (23).

Las preparaciones de CR obtenidas de Rps. spheroides y R. rubrum, contienen 3 polipéptidos con pesos moleculares de 21, 24 y 28 Kdalton (14; 17; 46 - 48). Dichos polipéptidos se hallan en una estequiometría de 1 : 1 : 1.

Todos son extremadamente hidrofóbicos, aproximadamente el 70% de sus aminoácidos son no polares. Si se trata la preparación del CR de Rps. spheroides con 0.1% SDS en presencia de 0.01% LDAO, la banda de 27 Kd. se disocia del tríó dejando toda la Bchl y Bpheo unida al complejo de los otros dos (17).

Este tratamiento también remueve el hierro del complejo y causa un corrimiento de la banda del complejo P870 de 865 a 855 nm, no obstante el complejo de los dos polipéptidos más livianos retiene la actividad fotoquímica, al menos a temperatura ambiente.

El tratamiento de los CR con agentes caotrópicos (C104Li), causa una disociación similar de los polipéptidos (17). En este caso el complejo de los dos polipéptidos más pequeños retiene su actividad fotoquímica aún a muy bajas temperaturas.

5.- Rendimiento cuántico de la fotooxidación del P870

Wraight y Clayton (49) han descripto medidas altamente precisas del rendimiento cuántico de la fotooxidación del P870 en preparaciones de CR obtenidas de Rps. spheroides (R26). Así midieron los cambios de absorbancia ópticos a 865 nm debidos a la fotooxidación del P870.

Prestando cuidadosa atención a posibles fuentes de error, encontraron que la excitación a 880 nm conduce a la fotooxidación con un rendimiento cuántico de 1.02 ± 0.04 .

6.- Cinética de la fotooxidación del P870

Por lo anterior se ha visto que la mayoría de los ejemplos de Bchl in vitro involucran el estado triplete y esto probablemente es una consecuencia del largo tiempo de vida media del triplete, respecto al de los estados excitados más altos (singlet). El tiempo de vida media natural del estado singlet excitado del P870 es entre 20 y 30 ns segundos (50; 51) no muy diferente del de la Bchl monomérica en solución, la probabilidad de fotooxidación del P870 durante este período, necesita ser independiente de las colisiones intermoleculares.

Netzel y colaboradores (52) intentaron medir la velocidad de fotooxidación del P870 directamente, después de la excitación de los CR con un flash a 530 nm, que dura aproximadamente 6 ps segundos.

Encontraron que la desaparición (bleaching) de la banda a 865 nm ocurre dentro de los 7 ± 2 pseg. después del flash. No es claro, sin embargo, si este decrecimiento en absorbancia representa la oxidación del P870 realmente, o meramente la conversión del complejo de su estado base en el estado singlet excitado. Se podría esperar también que este proceso causara un bleaching de la banda de absorción a 870 nm.

Otro enfoque de la cinética de la reacción de transferencia de electrones es obtener el tiempo de vida media del estado singlet excitado del P870, midiendo el tiempo de vida media de la fluorescencia. Este no fue medido directamente pero Zankel y cola-

boradores (51) y Slooten (50) lo calcularon del rendimiento de fluorescencia y del tiempo de vida media natural. Se sabe que células ó cromatóforos de bacterias fotosintéticas emiten fluorescencia de Bchl antena y compite con la utilización de energía en el CR. El rendimiento de la fluorescencia del P870 medido en ausencia de Bchl antena, es pequeño comparado con el de la Bchl antena medido en cromatóforos. Este bajo rendimiento muestra que la energía que alcanza este pigmento es disminuída rápidamente, y la alta eficiencia cuántica de la oxidación del P870 muestra que la mayoría de esta disminución (quenching) es debida a la iniciación de la fotoquímica.

Si la única ruta para la de-excitación fuera la natural, el rendimiento sería del 100% y el tiempo medio de de-excitación tomaría el valor máximo, τ_0 (tiempo medio radiativo natural). Si la de-excitación ocurre por otros procesos que compiten, el tiempo medio τ y el rendimiento de la fluorescencia ϕ_F disminuirán proporcionalmente.

$$\tau = \phi_F \cdot \tau_0$$

7.- Mecanismo de la fotooxidación del P870. Estados de transición a bajos potenciales redox.

Estudios de EPR de preparaciones de CR han mostrado que excitaciones por flash a bajos potenciales redox resultan en la formación de un estado triplete (53). El rendimiento cuántico del triplete no ha sido medido en valores absolutos pero usando exci-

tación por flash laser y comparando la curva de saturación de luz de la señal EPR del triplete con la de la formación del radical libre debido a la fotooxidación del P870, en iguales condiciones, surge que el rendimiento cuántico de la formación del triplete es casi el mismo que el de la fotooxidación del P870 a la misma temperatura (54), y esto indica que se genera un triplete por cada CR.

Midiendo cambios de absorbancia ópticos en bacterias fotosintéticas Parson y colaboradores (55) descubrieron la formación de dos diferentes estados transitorios del CR a bajos potenciales redox. Los dos estados que ellos llamaron "PF" y "PR" difieren uno de otro, cinética y espectralmente (55).

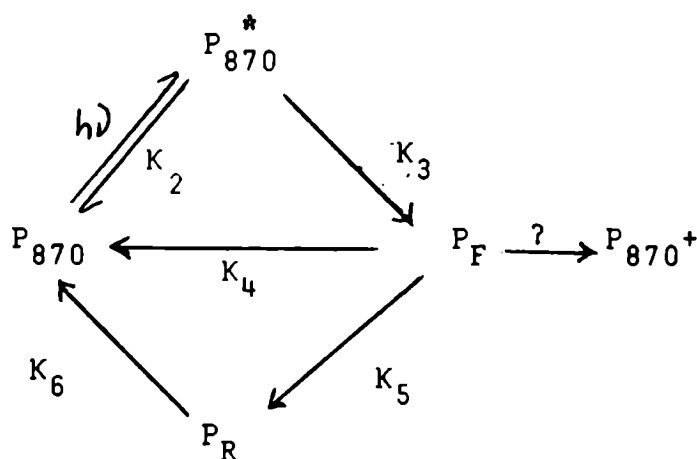
Ambos estados se pueden observar a potenciales tan bajos como -450 m V y no hay ninguna indicación de cambios de absorbancia debido a PF ó PR cuando se exponen preparaciones de CR a flashes, a potenciales redox mayores o iguales a 550 mV, necesarios para oxidar $P_{870} \longrightarrow P_{870}^+$ en la oscuridad. El estado PF tiene un tiempo de vida media extremadamente corto, entre 1 - 10 nseg. A 15°K es apenas más lento ($T_{1/2} = 20$ nseg.).

El estado PR tiene un $T_{1/2}$ de decaimiento de 6 useg a temperatura ambiente, se vuelve más lento a bajas temperaturas, poniendo en juego una energía de activación de 200 cal/mol, debajo de 160°K es independiente de la temperatura.

El rendimiento cuántico del estado PF (corta vida media) es cercano a 1 a temperatura ambiente y a 15°K (55). El del estado PR (larga vida media) es muy bajo a temperatura ambiente

(aproximadamente 0.1) pero incrementa progresivamente al bajar la temperatura, debajo de 20°K el rendimiento cuántico de PR es tan alto como el del estado PF.

El estado PF no puede ser idéntico al estado singlet excitado de P_{870} ya que su tiempo medio de 1-10 nseg es mucho mayor que el tiempo medio de 20 pseg que obtienen Zankel (51) y Slooten (50) para el estado singlet. Aceptando que PF no es el estado singlet del P_{870} , Parson y colaboradores (55) proponen el siguiente esquema que interpreta las interrelaciones entre PF, PR, el estado base P_{870} y el estado singlet P_{870}^* .



La constante de velocidad K_2 para el pasaje de $P_{870}^* \rightarrow P_{870}$ tiene en cuenta el muy corto tiempo de vida media de P_{870}^* y el muy bajo rendimiento de fluorescencia.

El estado PF decae por 2 caminos, K_4 , volviendo directamente a P_{870} y K_5 , dando lugar al estado P_R . A temperatura ambiente el camino $P_F \xrightarrow{K_4} P_{870}$ está favorecido, el rendimiento cuántico de P_R es muy bajo.

Parson (55) propone que la reacción de transferencia de electrones podría partir del estado PF ($PF \longrightarrow P_{870}^*$). Esta propuesta podría explicar el hecho de que un bloqueo de la reacción de transferencia de electrones provoca sólo un pequeño efecto sobre la fluorescencia de P_{870}^* y también podría concordar con el alto rendimiento cuántico de PF, tanto a temperatura ambiente como a bajas temperaturas.

En cambio, el estado PR, que tiene un rendimiento cuántico relativamente pobre a temperatura ambiente, es mucho menos probable que sea un intermediario en la reacción de transferencia de electrones.

También es probable que las condiciones que se usan para bloquear la reacción de transferencia de electrones causen algún cambio importante en alguna de las constantes de velocidad, y podría ser que el estado PF no sea un intermediario en la reacción de transporte de electrones sino más bien un producto lateral que se forma, si se bloquea la reacción de transferencia normal. Sin embargo, en contra de la idea de que la transferencia de electrones ocurra directamente de P_{870}^* , Parson (55) postula que la reducción del aceptor de electrones causa un incremento de casi 100 veces en K_3 , por otro lado, si la reacción ocurre vía PF, se debería poder explicar el incremento de 3 veces en la fluorescencia que acompaña la reducción del aceptor.

Una posibilidad es que parte de la fluorescencia sea fluorescencia retardada (delayed) resultante de la conversión de

PF \longrightarrow P₈₇₀⁺, si este fuera el caso, el aumento del rendimiento de fluorescencia, dependería de la temperatura, y no hay en la literatura información que apoye o descarte esta idea. Una explicación alternativa es que la reducción del aceptor de electrones cause un decrecimiento de 3 veces en K₃, este cambio relativamente pequeño no modificaría el alto rendimiento cuántico de PF, que seguiría siendo cercano a 1. Evidentemente la identificación de los estados PF y PR es una cuestión difícil de resolver, y también lo es si existe alguna relación entre estos estados y el estado triplete que Leigh y Dutton (56) detectaron por medidas de EPR.

Para aclarar si el estado transitorio PF es un intermedio en la reacción de transferencia de electrones Rockley y colaboradores (57) realizaron una serie de experimentos utilizando técnicas que les permitieron medir en el orden de los pseg., y determinaron que la cinética de desaparición de PF es esencialmente idéntica a la de la formación de P₈₇₀⁺ y este hecho apoya la conclusión que P₈₇₀⁺ se forma a partir de PF, es decir que PF parece ser un intermediario en la fotooxidación de P₈₇₀ \longrightarrow P₈₇₀⁺.

Estos resultados están de acuerdo con los resultados de Kaufmann y colaboradores (58).

Un punto interesante, es el rol de Bpheo en el proceso primario. Ya había sido demostrado, in vitro, la capacidad de la Bpheo para ser fotoreducida (59). In vivo, la fotoreducción de la Q se vió que estaba acompañada por un shift de la banda de 760 nm de la Bpheo, con pequeños cambios a 540 nm, tanto en Rps. spheroides

(60) como en R. rubrum (61). Por otro lado la fotoreducción reversible de la Bp heo se encontró que estaba relacionada a la actividad del CR (62).

Muy recientemente se han descrito, evidencias experimentales para la transferencia de electrones fotosensibilizada por la Bchl, del citocromo c a un complejo-pigmento P760 que involucra Bp heo 760 y Bchl 800 en el CR de Cromatium minutissium. Shuvalov y Klimov (63) sugieren que la fotoreducción de P760 ocurre por la interacción del citocromo c reducido con el ($P_{890}^+ \cdot P_{760}^-$) en el CR, y que ésto es inducido por la luz. A bajos potenciales redox, el cambio de absorbancia inducido por un flash de luz, se ve que se relaciona con la formación de un estado carotenoide triplete (car^T) con un

$$\tau_{1/2} = 6 \text{ u seg a } 20^\circ\text{C.}$$

Este estado (car^T) no se forma cuando P_{760} es reducido a 293° y 160° K. Shuvalov y Klimov (63) sugiere que este estado se forma a partir del estado birradical ($P_{890}^+ \cdot P_{760}^-$) directamente, o vía PR (64). El birradical parece ser un producto primario de la reacción a la luz en los CR bacterianos, y es probablemente semejante al estado PF, descrito antes (58; 65). Resultados similares se obtienen en Rps. viridis (66).

Una de las preguntas que surge en la actualidad es si PF es parte de un mecanismo general para reacciones primarias de transferencia de electrones en la fotosíntesis bacteriana.

En los CR que contienen carotenoides, la cinética de formación del estado PF parece ser igual a la del estado (car^T), y los rendimientos cuánticos de ambos estados son indistinguibles,

de aquí se sugiere que PF se convertiría cuantitativamente en (car^T) (64) como no hay evidencias para la formación de PR en ninguno de los CR conteniendo carotenoides (64), se asume que (car^T), se forma directamente de PF, sin la formación del intermediario PR.

Sin embargo, en CR de Rps. spheroides R26, la excitación a bajos potenciales redox causa la aparición, de una señal EPR de triplete (56) que probablemente refleja el estado PR (55), y Leigh y Dutton (56) y Uphaus (67) han observado la misma señal EPR en cromatóforos y células de cepas que contienen carotenoides. Esta observación es conflictiva, con los resultados de Codgell y colaboradores (64), donde cepas con carotenoides exhiben estados como (car^T) y PF, pero no PR.

8.- El aceptor de electrones.

a.- Generalidades

El aceptor primario de electrones se define como el primer componente que recibe un electrón del donador primario, P_{870} . Puede tratarse de más de una molécula (por ej.: un pool de aceptores) ó puede haber varios aceptores primarios diferentes para el donador (en cambios paralelos).

Una amplia variedad de compuestos han sido propuestos para cubrir el rol de aceptores primarios en los CR. Estos incluyen quinonas, proteínas con hierro no hémico, pteridinas, citocromos, una segunda molécula de clorofila, y otros componentes identificados en

términos de cambios de absorbancia y/ó señales EPR.

De todos estos compuestos, las investigaciones más recientes apuntan hacia las quinonas o el Fe como posibles aceptadores primarios de electrones.

Candidatos previos como las pteridinas actualmente están descartados. Reed y Mayne (68) buscaron pteridinas en cromatóforos y CR preparados de Rps spheroides R26 y encontraron una cantidad demasiado pequeña, insuficiente para cubrir el rol de aceptor primario.

Se han hecho muchas pruebas para saber si la quinona ó el Fe es el aceptor primario o si es un complejo que involucra a ambos. Se han seguido 2 líneas generales de enfoque:

Un enfoque es refinar ó modificar las preparaciones de CR de forma de eliminar uno de los 2 carriers, y examinar de que manera ese tratamiento afecta su actividad fotoquímica.

El otro es tratar los CR ó los cromatóforos de manera de reducir el aceptor, química o fotoquímicamente y registrar señales ópticas ó de EPR debidas al aceptor reducido.

Ambos enfoques han conducido a resultados conflictivos ya que algunos experimentos favorecen a la ubiquinona y otros al Fe como aceptor primario de electrones.

b.- Tamaño del pool de acptores primario.

Parson (69) ha demostrado que el tamaño del pool de aceptores primarios de electrones en C.vinosum es 1 equivalente/mol

de P870.

La excitación de cromatóforos de C. vinosum con un simple flash de luz de 20 nseg. provoca una transferencia de electrones del P870 al aceptor, luego el P870 se reduce otra vez con un tiempo medio de 1-2 useg. después del flash. Un segundo flash en este momento no producirá fotooxidación del P870, aunque éste haya vuelto a su estado reducido. Esto significa que el aceptor primario puede recibir sólo 1 electrón y que el aparato fotoquímico permanece inactivo hasta que el electrón haya pasado a un aceptor secundario.

Clayton y colaboradores (70) han llegado al mismo tamaño del pool de aceptores primario que Parson, en Rps spheroides, estudiando la cantidad de citocromo agregado que puede oxidar la preparación de CR.

En presencia de ortofenantrolina, para bloquear la reacción de transferencia secundaria de electrones, una iluminación continúa causa la rápida fotooxidación de 1 mol de citocromo/mol de P870. Esto nuevamente se interpreta como que el aceptor primario puede acomodar 1 equivalente de electrones por mol de P870.

A bajas temperaturas, la cinética con la cual el aceptor primario de electrones pasa de su forma reducida a su forma oxidada, depende si puede o no volver el electrón al P870. Si el P870+ es reducido en varios useg. por el citocromo, como ocurre en cromatóforos de muy diferentes especies, no es más posible su interacción rédox con el aceptor de electrones, y entonces la

reducción del aceptor es irreversible. Un segundo flash no causará la fotooxidación del P870 aunque se esperen varios minutos entre los flashes (71).

Por otro lado si se evita que el citocromo reduzca al $P870^+$ elevando el potencial redox de tal manera de oxidar el citocromo químicamente, (o trabajando con CR carentes de citocromo) puede ocurrir la reacción inversa entre el $P870^+$ y el aceptor de electrones reducido; oxidándose el aceptor y reduciéndose el $P870^+$. Si esto ocurre, la fotooxidación del P870 y su recuperación, ocurrirá repetidas veces en respuesta a repetidos flashes.

Resumiendo estos experimentos se puede decir que debe haber muchos candidatos para el rol de aceptor primario de electrones. Dicho aceptor se debe reducir totalmente con un corto flash de luz, tanto a temperatura ambiente como a muy bajas temperaturas, su fotoreducción no debe ser sensible a la o-fenantrolina, pero sí debe serlo su reoxidación a temperatura ambiente. A bajas temperaturas, la fotoreducción debe ser irreversible, si a la reacción primaria le sigue la oxidación del citocromo, y reversible, si se evita la oxidación del citocromo.

c.- Titulaciones redox del aceptor primario de electrones.

Si se atribuye a la fotoreducción del aceptor primario de electrones, una señal EPR inducida por la luz, o un cambio de absorbancia, también se debería poder generar la misma señal por

medio de una reducción química en la oscuridad, la reducción química causaría pérdida de la actividad fotoquímica, y si se hace una titulación redox de la actividad fotoquímica debería ser paralela a una titulación redox en oscuridad del cambio de absorbancia, ó de la señal EPR. Muchos investigadores han medido los potenciales medios de aceptores primarios de electrones para diferentes especies de bacterias fotosintéticas.

En cromatóforos de Rps. spheroides el $E_{m,7}$ del aceptor de electrones es -20 mV (72). En presencia de o-fenantrolina el $E_{m,7}$ cambia a +40 mV (73). Con cromatóforos de C. vinosum y Rps. viridis se obtienen valores de $E_{m,7}$ menores, (73; 74) y se observan efectos similares de pH y o-fenantrolina.

Contrariamente titulaciones de CR de Rps. spheroides dan $E_{m,7}$ de -50 mV que es independiente del pH e insensible a la o-fenantrolina (75; 76). De acuerdo con Parson (77) es posible que el efecto de la o-fenantrolina no refleje un cambio genuino en el $E_{m,7}$ del aceptor primario de electrones, sino más bien una pérdida prematura de actividad fotoquímica que resulta en la inhibición de la reacción de transferencia de electrones.

Los trabajos de Silverstein y Gromet-Elhanan (78) y Govindjee (79) surgieron que el aceptor de electrones de R. rubrum dá $E_{m,7}$ muy bajos.

Estos investigadores demostraron que potenciales tan bajos como el de los colorantes benzilviológeno ($E_{m,7} = -320$ mV) y metilviológeno ($E_{m,7} = -440$ mV) pueden acelerar la cinética de desapa-

rición de los cambios de absorbancia inducidos por la luz en cromatóforos.

d.- Evidencias que postulan al Fe como aceptor primario de electrones.

Dutton y Leight (53; 80; 81) manteniéndolo el potencial redox de suspensiones de cromatóforos de C. vinosum a varios niveles, descubrieron una serie de medidas de EPR que indican que el átomo de Fe del CR es el aceptor primario de electrones.

La señal EPR del Fe se obtiene por reducción química del CR, en oscuridad o por iluminación.

Por otro lado Feher y colaboradores (82) reemplazaron parte del Fe de los CR de Rps. spheroides por Mn, los cuales exhiben un espectro EPR que es similar al de la preparación nativa. Por esto Feher concluye que es improbable que el Fe sólo sea el aceptor primario de electrones. Una posibilidad particularmente interesante es que el Fe esté complejo a la ubiquinona del CR. Complejos de este tipo entre Fe y ubiquinona, han sido propuestos por varios investigadores (83-86).

Sin embargo Halsey y Parson (87) han extraído de ubiquinona de cromatóforos de C. vinosum y encontraron que esto no tiene efecto sobre la señal EPR del Fe.

e.- Evidencias que postulan a la ubiquinona como aceptor primario de electrones.

Feher y colaboradores (88) demostraron que los CR de Rps. spheroides ó partículas subcromatofóricas son tratadas de tal manera de eliminar el Fe, no pierden la capacidad de realizar fotooxidación de P870.

Loach y Hall (85) encontraron que si iluminaban preparaciones deficientes en Fe de R. rubrum aparece una nueva señal EPR en lugar de la señal del Fe.

Luego de la iluminación de CR de Rps. spheroides se han observado cambios de absorbancia ópticos que sugieren la formación del anión semiquinona de la ubiquinona. Para visualizar el espectro de estos cambios de absorbancia, Clayton y Straley (60; 89) agregaron donores de electrones a la preparación para conservar el P870 en su forma reducida, si se ilumina en estas condiciones ocurren cambios de absorbancia debidos a la reducción del aceptor de electrones endógeno y a la oxidación del donador de electrones agregado. Si se compara con los cambios debidos a la conversión de la Q en sus radicales aniónicos y neutros (90), se ve que los cambios de absorbancia que ocurren en el CR son similares a los primeros (radicales aniónicos). Slooten ha obtenido (91) un espectro de diferencia muy similar.

En apoyo de la idea que postula que los cambios de absor-

bancia representan la variación rédox del aceptor primario de electrones, está el hecho que su generación en la luz no es sensible a la ofenantrolina (60; 92).

Si el aceptor primario de electrones es ubiquinona, o un complejo ubiquinona-Fe, se podría esperar que la extracción de la ubiquinona del CR inactivara el aparato fotoquímico.

Cogdell y colaboradores (92) encontraron que extrayendo cromatóforos o CR de Rps. spheroides con isooctano no ocurre fotooxidación del P870. La adición de cantidades casi estequiométrica de ubiquinona ó 1-4 naftoquinona restaura la actividad fotoquímica, con alto rendimiento cuántico.

De todos estos experimentos parece claro que la ubiquinona juega un importante rol en la reacción fotoquímica primaria aunque no pruebe per se que es el aceptor primario de electrones.

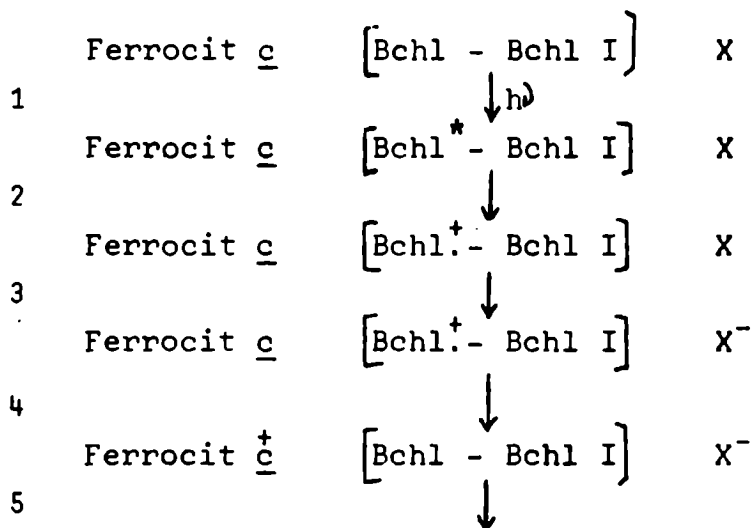
Muchas de estas conclusiones discordantes podrían explicarse si se asume que el aceptor primario de electrones es un complejo de ubiquinona-Fe. En este caso alguno de los componentes del complejo podría retener su actividad para servir como aceptor primario aunque la estructura del complejo fuera perturbada. A pesar de que no hay ninguna evidencia firme para la existencia del complejo ubiquinona-Fe, los trabajos más recientes (93; 94), consideran como posible aceptor primario al complejo ubiquinona-Fe (QFe).

Prince y colaboradores determinaron el Em para un carrier de electrones intermediario, que actúa entre la Bchl del CR y el aceptor primario en Rps. viridis (93) y en Cromatium vinosum (94).

Varios investigadores (57; 58; 65; 95) han medido la cinética de oxidación y reducción de los reactantes primarios, de esto resulta claro que mientras el aceptor primario reducido, es la primera especie reducida (estable en el orden de los mseg.), ocurren al menos, 2 reacciones primarias entre el dímero de Bchl: $(Bchl)_2$ del CR antes de la reducción del aceptor primario.

Utilizando espectroscopía que permite medir en el orden de los psegundos, se ha determinado que el electrón es eyectado del $(Bchl)_2$ dentro de los 10 pseg. del flash de luz, aunque no alcance al aceptor primario hasta 100-200 pseg después. Durante este tiempo el electrón presumiblemente resida en un carrier de electrones intermediario, fuertemente reducido, llamado I, que Fajer y colaboradores (96) sugirieron que es Bpheo.

Esto apoya el siguiente esquema (57; 58), donde X es el aceptor primario de electrones, muy probablemente: QFe



Recombinación vía transporte cíclico de electrones

En Rps. viridis, Prince y colaboradores (105), han probado este comportamiento, y determinaron el E_m , para la cupla $I/I^- =$

- 400 mV. En Rps. spheroides, había sido medido de una manera indirecta y resultó ser más negativo que - 430 mV (65). En Cromatium vinosum (94), se han determinado propiedades espectrofotométricas y de EPR de I^- .

En la actualidad este tema ha cobrado un gran auge y varios grupos de investigadores están trabajando para clarificar totalmente el proceso de transferencia primaria de electrones de la fotosíntesis bacteriana.

GENERALIDADES SOBRE BACTERIAS FOTOSINTETICAS

Las bacterias fotosintéticas conocidas hasta el presente están ubicadas en 3 grupos principales que son:

- 1.- Las bacterias púrpuras y marrones no sulfurosas o Athiorhodaceas, cuyos principales géneros son: Rhodospseudomonas, Rhodospirillum y Rhodomicrobium.
- 2.- Las bacterias púrpuras del azufre o Thiorhodaceae, cuyas especies más conocidas son Chromatium y Thiospirillum.
- 3 - Las bacterias verdes del azufre o Chlorobacteriaceas cuyos géneros más representativos son Chlorobium y Chlorospseudomonas.

El modo de vida fotosintético de estas bacterias a diferencia de las plantas y algas eucarióticas, se caracteriza porque ocurre sin evolución oxígeno y sólo bajo condiciones anaeróbicas.

La fotosíntesis bacteriana depende de la presencia de donores de electrones externos, tales como compuestos reducidos de azufre ó compuestos orgánicos.

Las Athiorhodaceae fotometabolizan sustancias orgánicas simples y son inhibidas por el sulfuro de hidrógeno. La mayoría de las especies son anaerobios facultativos. Algunas especies también pueden crecer fotoautotróficamente.

Las Thiorhodaceae son fotoautotróficas, fijan CO_2 con la concomitante oxidación de sulfuro de hidrógeno a sulfato, muchas especies

son potencialmente mixotróficas, es decir, al igual que las Athiorhodaceae son capaces de fotoasimilar compuestos orgánicos.

Las Chlorobacteriaceae son predominantemente fotoautotróficos obligados, sólo una especie: *Chloropseudomonas ethylicum*, es capaz de crecer fotoorganotróficamente.

Como su nombre lo indica, las Chlorobacteriaceae, son verdes, mientras que las Thio y Athiorhodaceae varían en una gama de púrpura, rojas y marrones.

Todas las bacterias fotosintéticas contienen clorofila y pigmentos carotenoides, la diferencia en el color de sus cultivos se debe principalmente a variaciones en la naturaleza y proporciones de los componentes carotenoides. Las condiciones ambientales también pueden tener influencia sobre el color de los cultivos; por ejemplo, cultivos de bacterias verdes ó sulfurosas púrpuras creciendo en presencia de sulfuro de hidrógeno son usualmente opacos, debido a la presencia de gránulos de azufre altamente refringentes.

En las Thiorhodaceae estos gránulos se encuentran dentro de las células y en las Chlorobacteriaceae, más pequeñas, se hallan en el exterior.

Una vez que todo el sulfuro se ha oxidado a sulfato; los cultivos se tornan más transparentes y su coloración es más intensa.

Las principales características metabólicas, mencionadas antes, definen el nicho ecológico ocupado por estas bacterias en la naturaleza.

Así es que se las encuentra en las partes anaeróbicas de toda clase de medioambientes acuáticos, desde tierras húmedas y fangosas hasta lagunas, pozos, lagos, ríos y habitats marinos.

Descripción de Rhodopseudomonas viridis

La bacteria fotosintética utilizada para este trabajo es Rps. viridis, es una bacteria púrpura no sulfurosa, perteneciente a las Athiorhodaceae. Son pequeños bastones, polarmente flagelados, no formador de esporos, Gram negativo, contiene bacterioclorofila b a diferencia de la mayoría de las bacterias fotosintéticas.

Posée un metabolismo heterotrófico; crece a expensas de una variedad de compuestos orgánicos simples y requiere vitaminas del grupo B para su crecimiento.

Contrariamente a la mayoría de las Athiorhodaceae, Rps. viridis es incapaz de crecer aeróbicamente en la oscuridad, o lo hace muy lenta y escasamente, comportándose como un anaerobio obligado.

Bajo condiciones de crecimiento fotosintético, todos los miembros de las familias Thiorhodaceae y Athiorhodaceae desarrollan estructuras de membrana intracitoplasmática muy características. La forma y disposición de estas estructuras en las células es estable y por lo tanto de gran valor taxonómico.

En el caso particular de Rps. viridis, la membrana intra-

citoplasmática presenta estructuras semejantes a las granas, como en cloroplastos, con lamelas paralelas, lo que le confiere a la estructura un alto grado de orden.

OBJETIVOS DE ESTA INVESTIGACION

La conversión de energía electromagnética en energía química, que es utilizada metabólicamente por los organismos que fotosintetizan, ocurre en las plantas verdes a través de un complejo de clorofila y proteína y en las bacterias fotosintéticas en un complejo de bacterioclorofila y proteína, presente en los centros de reacción, localizados en la membrana intracitoplasmática.

En las bacterias fotosintéticas cultivadas en condiciones fototróficas la membrana citoplasmática se invagina (97; 98), extendiéndose hacia el interior de la célula de muy variadas formas, según las especies, estas invaginaciones que contienen todos los pigmentos fotosintéticos, se denominan cromatóforos, los hay en forma de vesícula, lamelas paralelas y ramificadas, y en forma de granas.

La figura 7 muestra en forma esquemática los diferentes tipos estructurales de membranas intracitoplasmáticas encontradas en bacterias fotosintéticas.

Nuestro plan de trabajo pretende llevar a cabo el aislamiento purificación y caracterización del CR de una bacteria fotosintética, heterotrofa, anaerobia obligada, Rps. viridis, así como efectuar una caracterización de las membranas que forman el aparato fotosintético de esta bacteria.

Para lo cual hemos llevado a cabo:

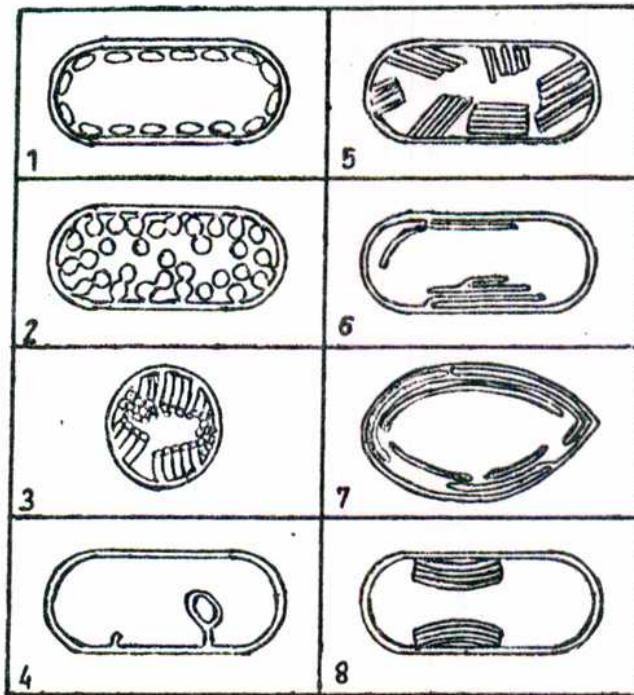


Figura 7:

Disposición de estructuras membranosas intracitoplasmáticas de bacterias fotosintéticas. 1. Vesículas de *Chlorobium* en las bacterias sulfurosas verdes: *Chl. limicola*; *Chl. tiosulfatofilum*; *Chloropseudomonas etilicum*, etc. 2. Sistema de membranas vesiculares, en células de *R. rubrum*; *Rps. spheroides*; *Rps. capsulata*, etc. 3. Sistema de membranas tubulares en células de *Thiocapsa pfennigii* y algunas especies de *Thiococcus*. 4. Invaginaciones aisladas, pequeñas e irregulares en células de *Rps. gelatinosa* y *R. tenue*. 5. Superposiciones de cortas membranas dobles, unidas a la membrana citoplasmática de *R. molischianum*, *R. fulvum*, etc. 6. Lamelas paralelas parcialmente ramificadas e irregulares, encontradas en células de *Rps. palustris*, *Rps. acidófila*. 7. Capas concéntricas de dobles membranas en células de *Rhodomicrobium vanielii*. 8. Superposiciones de dobles membranas, semejantes a granas, casi paralelas a la membrana citoplasmática, encontradas en células de *Rps. viridis*. Esta figura está tomada de la referencia 98.

a.- Determinación del efecto de diferentes condiciones ambientales sobre el estado de las membranas aisladas por centrifugación en gradientes de sacarosa de extractos libres de células.

b.- Estudio comparativo entre membranas aisladas de células crecidas en distintos medios de cultivo. (en presencia y en ausencia de extracto de levadura).

c.- Diferentes procedimientos de aislamiento del CR, mediante el uso de detergentes iónicos como dodecil sulfato de sodio (SDS) y no iónicos como óxido de lauril dimetilamina (LDAO).

d.- Distintos métodos de purificación del centro de reacción mediante el uso de cromatografías de absorción en hidroxilapatita; precipitación fraccionada con sulfato de amonio; gradientes de sulfato de amonio, usando celite como soporte; cromatografías de intercambio iónico en DEAE celulosa y centrifugación en gradientes continuos de sacarosa.

e.- Caracterización del CR purificado enfocando hacia el estudio del espectro de actividad fotoquímica de preparaciones iluminadas, la determinación del peso molecular del complejo, empleando técnicas cromatográficas; disociación en subunidades, mediante el uso de agentes disociantes como SDS y β -mercaptoetanol (ME), por electroforesis en geles; determinación del peso molecular de las subunidades; estudio de la composición proteica del CR; determinación de la estequiometría de las diferentes subunidades en el complejo; composición de pigmentos y otros componentes de la partícula, citocromos y quinonas.

NOTA: Parte de los resultados de esta tesis han sido publicados en:

- Norma L. Pucheu, Norma L. Kerber y Augusto F. García.
FEBS Lett., 33 (1973), 119-124.
- Norma L. Pucheu, Norma L. Kerber y Augusto F. García.
Arch. Microbiol., 101 (1974), 259-272.
- Norma L. Pucheu, Norma L. Kerber y Augusto F. García
Arch. Microbiol., 109 (1976), 301-305.

MATERIALES Y METODOS

1.- Medios de cultivo utilizados para el crecimiento de Rps.viridis

a.- Medio de Hutner

Soluciones Stock:

Solución base concentrada (solución A).

Acido nitrilotriacético (NTA)	5	gr.
Sulfato de magnesio.7 H ₂ O	14.5	gr.
Cloruro de calcio	1.25	gr.
Molibdato de amonio.4 H ₂ O	4.6	mg.
Sulfato ferroso.7 H ₂ O	50	mg.
Metal 44	25	ml.

Se llevó a 1 litro con agua destilada. Se ajustó el pH a 6.8.

Succinato de amonio (solución B).

Acido succínico	59.5	gr.
-----------------------	------	-----

Se llevó a 500 ml con agua destilada. Se ajustó el pH a 6.8.

Buffer fosfato de potasio 0.5 M pH 6.8 (solución C).

Factor de crecimiento (solución D).

Biotina	2	mg.
Biocarbonato de sodio	50	mg.
Acido nicotínico	100	mg.
Clorhidrato de tiamina	50	mg.

Se llevó a 100 ml con agua destilada.

Solución glutamato - acetato (Solución E).

Glutamato monosódico	60	gr.
Acetato de sodio 3 H ₂ O	50	gr.

Se llevó a 500 ml con agua destilada.

Metal 44

EDTA	250	mg.
Sulfato de cinc.7 H ₂ O	1095	mg. (250 mg Zn)
Sulfato ferroso.7 H ₂ O	500	mg. (100 mg Fe)
Sulfato de manganeso.1 H ₂ O	154	mg. (50 mg Mn)
Sulfato cúprico.5 H ₂ O	39.2	mg. (10 mg Cu)
Nitrato de cobalto.6 H ₂ O	24.8	mg. (5 mg Co)
Tetraborato de sodio.10 H ₂ O	17.7	mg. (2 mg B)

Se llevó a 100 ml. con agua destilada.

El medio completo final contiene las siguientes cantidades de las soluciones stock anteriores:

Solución A	20	ml.
Solución B	20	ml.
Solución C	40	ml.
Solución D	2	ml.
Solución E ?	10	ml.

Extracto de levadura	1	gr.
Metal 44	1	ml.

Se llevó a 1 litro con agua destilada.

b.- Medio Hutner con leucina.

En algunos casos se crecieron las células en el medio de Hutner modificado de la siguiente manera: se eliminó el extracto de levadura del medio y se suplementó con el doble de la cantidad normal de factor de crecimiento y con 0,25 ml/l de leucina 4% en ClH 0.1 N.

c - Medio líquido sintético con malato como fuente de carbono.

Soluciones Stock

Solución base de sales

Sulfato de magnesio.7 H ₂ O	2	gr.
Cloruro de calcio.2 H ₂ O	0.75	gr.
Sulfato ferroso.7 H ₂ O	118	mg.
EDTA	200	mg.

Se llevó a 1 litro con agua destilada. Se ajustó el pH a 6.8.

Solución de trazas de elementos.

Sulfato de manganeso.4 H ₂ O	2.1	gr.
Acido bórico	2.8	gr.
Nitrato cúprico.3 H ₂ O	40	mg.
Sulfato de cinc.7 H ₂ O	240	mg.

Molibdato de sodio.2 H₂O 750 mg.
 Se llevó a 1 litro con agua destilada.

Solución de fosfatos

Fosfato monopotásico 40 gr.
 Fosfato dipotásico 60 gr.
 Se llevó a 1 litro con agua destilada.

Solución de DL málico al 20%

Se ajustó el pH a 6.8.

Sulfato de amonio 20%.

Solución de biotina

Biotina 10 mg.
 Etanol 50% 100 ml.
 Se diluyó 1/20 antes de usar.

El medio completo final contiene las siguientes cantidades de las soluciones stock anteriores:

Solución base de sales 100 ml.
 Biotina (Diluída) 3 ml.
 DL-málico 20% 10 ml.
 Sulfato de amonio 20% 2.5 ml.
 Solución de fosfatos (se agrega al final) 15 ml.

Se llevó a 1 litro con agua destilada. Se ajustó el pH a 6.8

d.- Medio sólido.

El medio sólido usado para crecer las células en punción, tiene la siguiente composición:

Extracto de levadura	3	gr.
Agar ..	15	gr.

Se llevó a 1 litro con agua destilada.

2 - Crecimiento de Rps. viridis.

El crecimiento se inició generalmente a partir del medio sólido, triturando la punción en el agar con un ansa estéril, se llenó con medio líquido el volumen del tubo, se incubó a 30°C con iluminación continua; este cultivo una vez crecido (3-4 días) se lo transfirió a frascos de 50 ml de capacidad, de allí a frascos de 500 ml de capacidad y así se obtuvo el inóculo, con suficiente cantidad de células viables, para crecer mayores volúmenes.

En general se utilizaron frascos de 4 litros, iniciando el desarrollo por el agregado de un 5 - 10% de inóculo, formado por células cultivadas aproximadamente 3 días en medio líquido. Se obtuvo así un buen desarrollo y las células estuvieron listas para ser cosechadas.

Alternativamente, las células se crecieron en medio de Hutner, o en medio sintético con malato como fuente de carbono, con el agregado de amino-ácidos marcados (C^{14}). En este caso se agregó al medio de cultivo usado, una mezcla de fenilalanina C^{14} ; leucina C^{14} ; e isoleucina C^{14} , 12.5 $\mu C/ml$ de medio de cultivo de cada uno de los amino-ácidos C^{14} mencionados.

3.- Cosecha de las células y preparación de los cromatóforos.

Las células se cosecharon por centrifugación en una centrífuga refrigerada a 18.000 g durante 10 minutos a 5°C. Se lavaron resuspendiéndolas en buffer fosfato de sodio (PBS) 10 mM pH 7.2 ó en buffer Tris-ClH 50 mM pH 8.0, (según el experimento). Se obtuvieron aproximadamente 6 gr de peso húmedo de células por litro de cultivo. Las células centrifugadas y lavadas se resuspendieron en el mismo buffer en que se las lavó, a una concentración aproximada de 200 mg de peso húmedo de células por ml de buffer, esta concentración resultó experimentalmente óptima para proceder a la ruptura de las células. Se rompieron por sonicación en un oscilador ultrasónico Branson (modelo W185) durante 10 minutos a 100 Wats a 0°C. El porcentaje de células rotas por este método es cerca del 95%, comprobado experimentalmente observando al microscopio la preparación antes y después de sonicar. El extracto de células rotas así obtenido, se centrifugó a 20.000 g durante 10 minutos, para eliminar las células enteras y debris celulares, algunas veces se repitió el proceso de centrifugación una vez más. El sobrenadante de esta operación se usó para algunos experimentos y se llamó "preparación de membrana cruda" PMC.

Para otros experimentos fue necesario eliminar el sobrenadante celular, en estos casos el sobrenadante de la centrifugación a 20.000 g se centrifugó a 144.000 g durante 90 minutos en el rotor N° 40 de la ultracentrífuga Spinco L2. Luego de esta centrifugación, el precipitado contiene la mayoría del pigmento original, y el sobrenadante, una serie de proteínas y algunos pigmentos solubles.

En algunos casos resultó conveniente tener sobrenadante celular totalmente libre de membrana; para ello se centrifugó el sobrenadante exhaustivamente a 144.000 g repetidas veces hasta no obtener precipitado.

Los cromatóforos sedimentados se lavaron 3 veces por resuspensión y centrifugación en el buffer usado en todo el proceso, quedando finalmente resuspendido en buffer y se obtuvo así la "preparación de membrana lavada", PML.

En la figura 8 se puede observar un esquema del proceso descrito.

4 - Obtención de fracciones subcromatoféricas.

Las preparaciones de membrana obtenidas por el procedimiento descrito anteriormente se sometieron a gradientes discontinuos de sacarosa en PBS 10 mM pH 7.2 preparados de la siguiente manera: 0,3 ml de 60%; 0.7 ml de 45%; 0.8 ml de 36%; 1 ml de 27%; 1.2 ml de 18%, luego se colocó 1 ml de membrana (conteniendo aproximadamente 10 mg de proteína por ml) en la parte superior del tubo y se centrifugó a 190.000 g durante 60 minutos en un rotor SW39.

El gradiente fue elegido experimentalmente como óptimo entre otros probados.

5.- Purificación del centro de reacción.

Se emplearon 3 procedimientos diferentes para la purificación del CR.

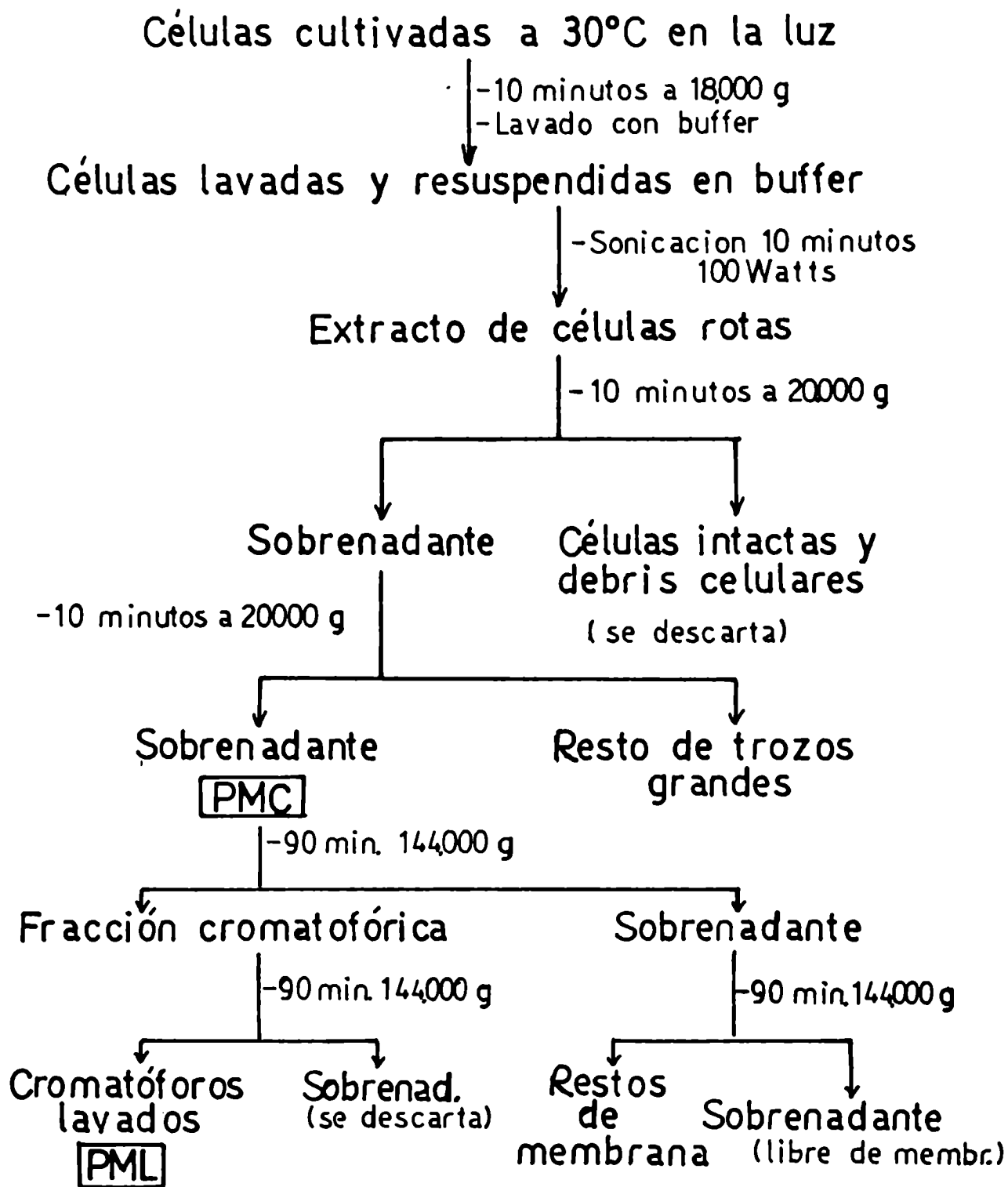


Figura 8:

Esquema de obtención de PMC, PML y sobrenadante libre de membrana.

a.- Procedimiento A: En este caso se usó un detergente iónico como el dodecil sulfato de sodio (SDS) para disolver la membrana.

En cada preparación se partió generalmente de 2 litros de células en medio de Hutner; a 30°C durante 3 días en la luz. Las células centrifugadas, lavadas y resuspendidas en buffer Tris-ClH 50 mM pH 8.0, se sonicaron y centrifugaron para obtener la PMC. A ésta se le agregó suficiente SDS 1% en Tris 50 mM pH 8.0, como para guardar una relación de: 12 mg de detergente/umol de bacterioclorofila (Bchl) (99). Para lograr un fraccionamiento adecuado en la cromatografía de hidroxilapatita (preparada como en (100)), la concentración final de SDS en la muestra no debe superar el 0.5% w/v.

La solución de membrana obtenida, se cromatografió a través de una columna de hidroxilapatita, de 4 cm de diámetro y 10-12 cm de altura, se eluyó con un gradiente discontinuo de fosfato entre 10 y 700 mM pH 7.0, conteniendo 200 mM NaCl. Los diferentes buffers de elución usados en esta cromatografía fueron:

- a.- PBS 10 mM pH 7.0; 200 mM NaCl.
- b.- PBS 100 mM pH 7.0; 200 mM NaCl.
- c.- PBS 200 mM pH 7.0; 200 mM NaCl.
- d.- PBS 350 mM pH 7.0; 200 mM NaCl.
- e.- PBS 700 mM pH 7.0; 200 mM NaCl.

De cada buffer se pasaron 100-200 ml a través de la columna, se recogieron fracciones de 5 ml. Las fracciones coloreadas obtenidas se siguieron por su espectro de absorción en el IR cercano (entre 600 y 1015 nm). El CR se eluyó de la columna con PBS

200 mM pH 7.0; 200 mM NaCl, y se detectó midiendo su absorción a 835 nm y a 975 nm (bandas características de la Bchl en el CR). Las fracciones eluidas con este buffer, contenían además una banda de absorción en 685 nm correspondiente a la Bchl antena oxidada; ésto demostró contaminación con Echl antena, es posible que hubiera también bacteriofeofitina (Bpheo) oxidada, cuyo máximo de absorción se encuentra en 684 nm. De todas las fracciones con espectro de CR se juntaron las que mantenían una relación de absorbancias OD_{685nm}/OD_{835nm} cercana a 3, estas fracciones se concentraron, dializaron contra Tris 50 mM pH 8.0 durante una noche, y se recromatografiaron en una columna de hidroxilapatita de 2 cm de diámetro y 15 de altura, se eluyó con un gradiente lineal entre 1 mM y 500 mM de PBS conteniendo 200 mM NaCl a pH 7.0. Se juntaron las fracciones coloreadas que presentaban una relación de absorbancias OD_{685nm}/OD_{835nm} menor o igual a 2, se concentraron por ultrafiltración, se pasaron a través de una columna de Sephadex G25 de 1 cm de diámetro y 20 cm de altura para eliminar el SDS que todavía acompañaba a la preparación, se dializó contra Tris 50 mM pH 8.0 conteniendo 10 mM $MgCl_2$.

El paso siguiente de purificación se basó en someter esta preparación de CR a un gradiente continuo de sacarosa entre 0.1 y 1 M en Tris 50 mM conteniendo 0.3% de Tritón X100 y urea 1.0 M pH 10 (AUT) (101; 102). Luego de 17 horas de centrifugación a 190.000 g se observó la presencia de una banda verde y otra marrón muy bien separadas, ubicadas aproximadamente en la mitad del gradiente. La fracción marrón corresponde al CR y la verde a la mayoría de la Bchl antena contaminante. La fracción CR así obtenida

se usa sin posterior purificación.

En la figura 9 se muestra un esquema que permite seguir fácilmente el procedimiento descripto.

b.- Procedimiento B.

En este caso, se utilizó un detergente no iónico, LDAO, para disolver la membrana.

En estas preparaciones se partió generalmente de 4 litros de cultivo en medio sintético con malato, crecidas a 30°C durante 3 días a la luz, pero iguales resultados se obtienen creciendo las células en medio de Hutner. Una vez obtenida la PML, se ajustó su densidad óptica a 1015 nm (máxima banda de absorción de la Bchl b de la membrana en el IR cercano) a un valor de 50. Luego se agregó suficiente LDAO 30% como para guardar la siguiente relación: 3 mg detergente/mg de proteína de membrana (15).

El paso siguiente fue una precipitación fraccionada con sulfato de amonio. A la membrana tratada con LDAO, se agregó sulfato de amonio 50% en Tris 50 mM pH 8.0 hasta lograr una concentración final de 23% w/v, se centrifugó a 25000 g durante 15 minutos, así se obtuvo un precipitado flotante que se descartó y un sobrenadante, que se precipitó con más sulfato de amonio 50% w/v en Tris 50 mM pH 8.0, hasta obtener una concentración final del 30% w/v, se centrifugó a 25000 g 15 minutos y se obtuvo un precipitado flotante color marrón conteniendo el CR y un sobrenadante con la Bchl antena. Este precipitado se resuspendió en

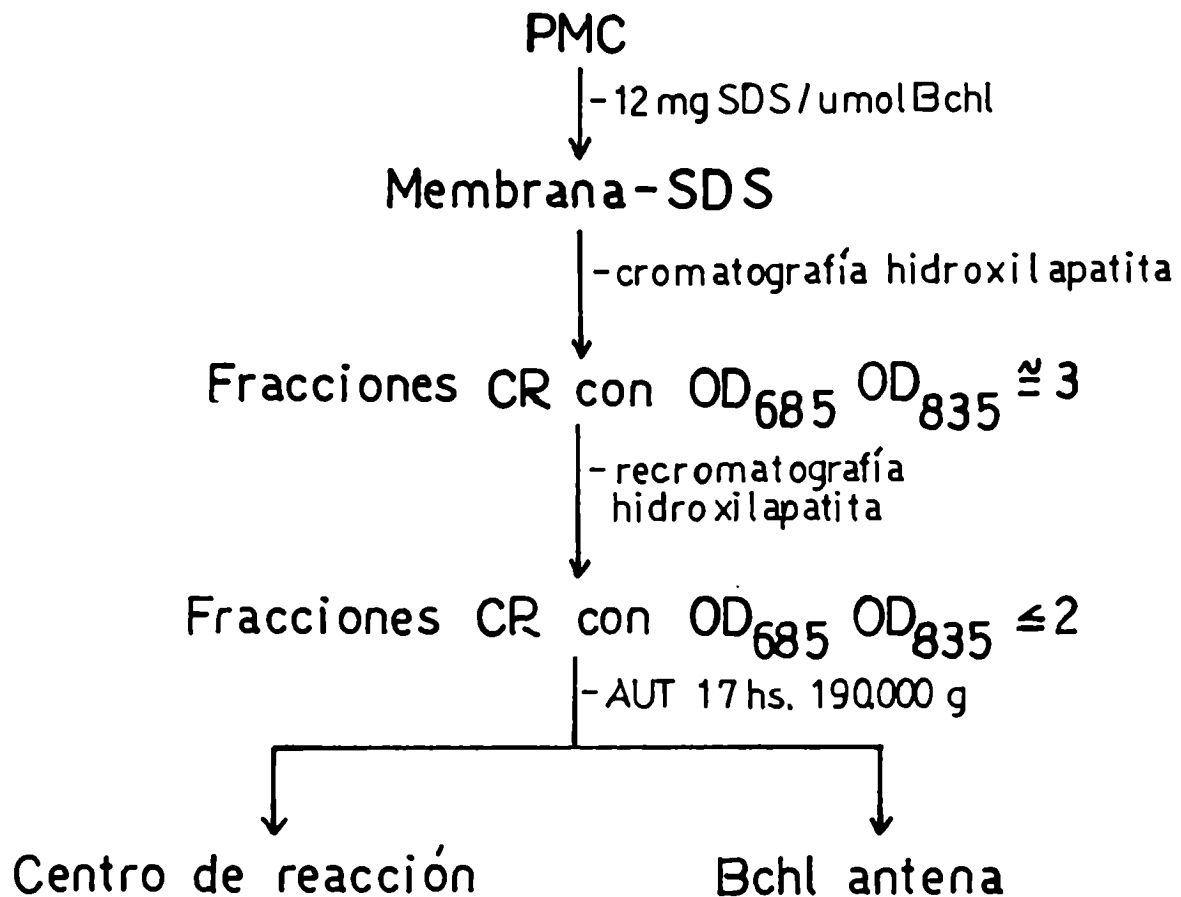


Figura 9:

Esquema de purificación del centro de reacción de Rps. viridis utilizando SDS (Proc. A).

aproximadamente 10 ml de Tris 50 mM pH 8.0. En algunas preparaciones, el último sobrenadante se precipitó con más sulfato de amonio 50% w/v para llevarlo a una concentración final de 38-40% w/v, se centrifugó a 25.000 g y el precipitado flotante formado se disolvió en Tris 50 mM pH 8.0 para obtener Bchl antenna.

Las concentraciones finales de sulfato de amonio óptimas usadas en este fraccionamiento, fueron determinadas experimentalmente, probando varias concentraciones y siguiendo la presencia del CR por su espectro de absorción característico en el IR cercano. Es importante destacar que la fracción que precipita entre 23 y 30% w/v de sulfato de amonio (concentración final), contenía aún cantidades significativas de Bchl antenna.

El paso siguiente consistió en un gradiente de sulfato de amonio en columna usando Hyflo supercell (celite) como soporte (103). A la preparación de CR obtenido anteriormente, $(CR-SO_4(NH_4)_2)$, se le agregó 1 gr de celite por cada 50 unidades de OD_{835nm} , sobre la suspensión obtenida se agregó suficiente sulfato de amonio 50% en Tris 50 mM pH 8.0, como para precipitar el CR (concentración final 30% w/v) y dejar la Bchl antenna en solución; con esta suspensión se armó una columna de 2 cm de diámetro que generalmente resultó de 5-7 cm de altura, se lavó con suficiente volumen de sulfato de amonio 30% w/v en Tris 50 mM pH 8.0 conteniendo 0.1% LDAO, como para eluir toda la Bchl antenna soluble, que se distinguió por su color verde y por su espectro de absorción en el IR cercano. Este lavado es un paso importante y debe ser muy eficiente; son necesarios aproximadamente unos 200 ml de

eluyente para lograr el efecto deseado, luego se conectó a la columna, un gradiente lineal de sulfato de amonio (en Tris 50 mM pH 8.0 con 0.1% LDAO) entre 30 y 10% w/v, las fracciones conteniendo CR (cuyo máximo eluye aproximadamente el 22% de sulfato de amonio en el gradiente) se seleccionaron juntando las que cumplen con las siguientes relaciones: OD_{280nm}/OD_{830nm} menores que 3.0 y simultáneamente OD_{830nm}/OD_{685nm} mayores que 6.0-. Estas fracciones se dializaron contra Tris 50 mM pH 8.0, conteniendo 1 mM EDTA y 0.1% LDAO. En esta etapa se obtuvo una preparación de CR con pequeña cantidad de Bchl antena, lo que se manifestó por su espectro de absorción en el IR cercano y con menor proporción de proteínas contaminadas.

El CR dializado (CR-celite) se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa, en una columna de 2 cm de diámetro y 20 cm de altura, equilibrada con el buffer de diálisis, el CR eluyó como una banda conteniendo todo el pigmento con este buffer. Se juntaron las fracciones que mantenían una relación de absorbancias OD_{280nm}/OD_{830nm} menores que 2.6. En esta etapa se obtuvo una disminución adicional de proteínas contaminadas, que eluyeron de la columna de DEAE celulosa en un gradiente de NaCl entre 0 y 0.5 M en Tris 50 mM pH 8.0 con 1 mM EDTA y 0.1% LDAO.

La fracción CR obtenida (CR-DEAE) se sometió a una centrifugación en gradiente continuo de sacarosa, entre 0.1 y 0.4 M en Tris 50 mM pH 8.0 con 1 mM EDTA y 0.6% LDAO, se centrifugó en el rotor SW50 a 250.000 g durante 17 horas. Se recogieron fracciones de 3 gotas/tubo (aproximadamente 40 fracciones), se registró la absorbancia a 830 nm y a 280 nm y se juntaron las fracciones pro-

teicas que contenían pigmento; dichas fracciones se concentraron por ultrafiltración con membranas XM100, se dializaron contra Tris 50 mM pH 8.0 conteniendo 1 mM EDTA y 0.1 % LDAO, y se sometieron a un nuevo gradiente continuo de sacarosa en idénticas condiciones a la centrifugación anterior. En este último paso se obtuvo el CR purificado, recuperándose el 1.5% de la proteína original.

Cualquier intento de purificación posterior no condujo a ningún incremento en la pureza.

En la figura 10 se muestra un esquema que describe este procedimiento.

c.- Procedimiento C.

Este tercer procedimiento, tiene algunos pasos en común con el procedimiento B: pero es más imple.

La membrana tratada con LDAO se dializó contra Tris 50 mM pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1% LDAO, durante una noche. El dializado se centrifugó a 144.000 g durante 30 minutos y el sobrenadante se cromatografió en una columna de DEAE celulosa de 2 cm de diámetro y 25 cm de altura, previamente equilibrada con el mismo buffer de diálisis. Se lavó la columna con buffer de equilibrio hasta que no se eluyó más proteína ni pigmento. Durante este lavado se eluyeron dos fracciones coloreadas, la primera fracción (verde) eluyó muy rápidamente, un espectro de absorción de ésta indicó la presencia de Bchl antena oxidada; la segunda (color marrón verdoso) mostró un espectro de absorción en el IR cercano con máximos a 685; 810

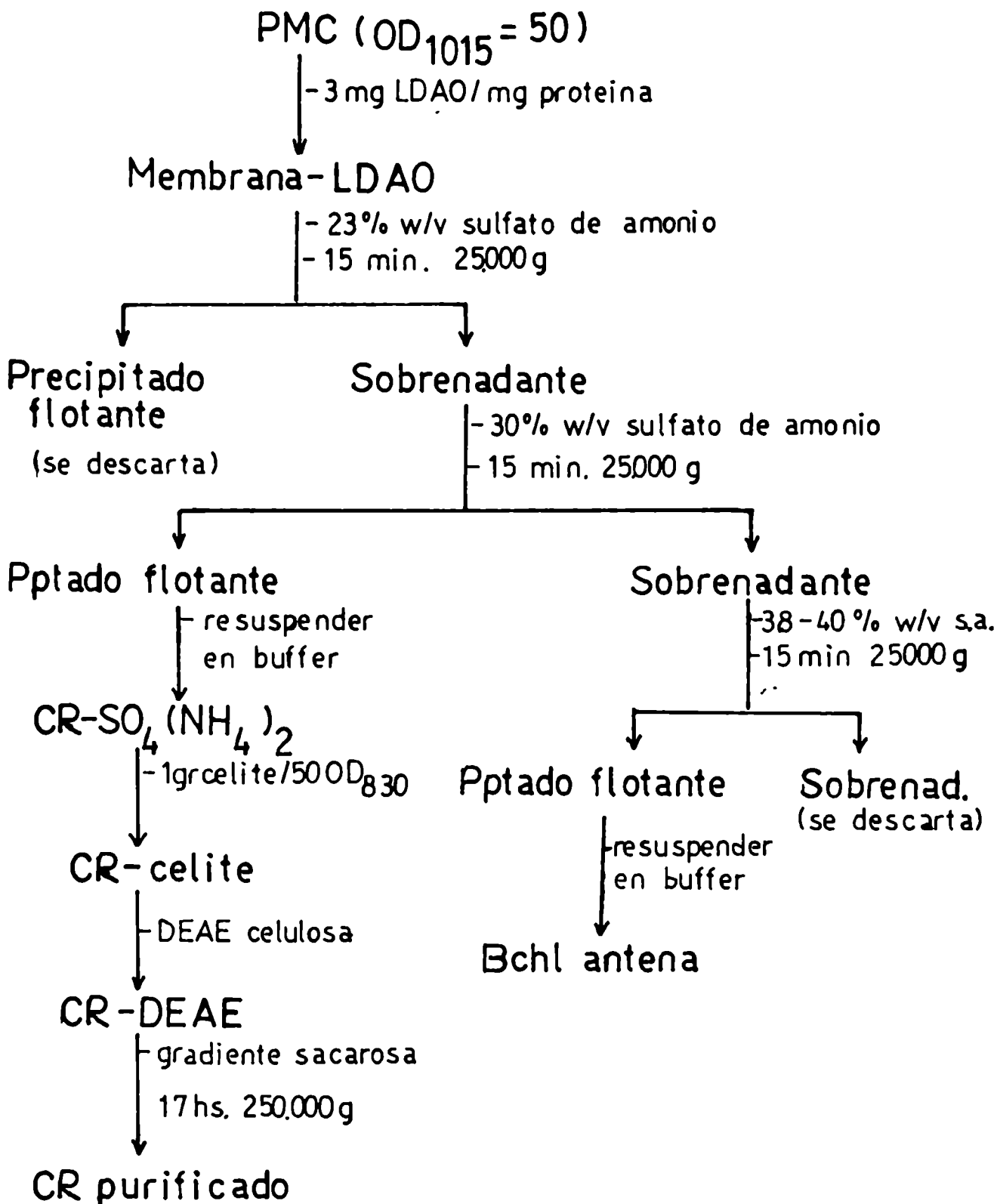


Figura 10:

Esquema de purificación del centro de reacción de Rps. viridis utilizando LDAO (Proc. B).

y 860 nm. No se realizó ningún estudio con esta fracción pigmentada.

Posterior lavado con buffer de equilibrio no eluyó ninguna otra fracción proteica ni pigmentada.

El CR eluyó al 0.15% de NaCl cuando se lo sometió a un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0.5% en el mismo buffer de equilibrio. Esta fracción se dializó contra Tris 10 mM pH 8.0, conteniendo 1 mM EDTA y 0.1% LDAO y se recromatografió en una columna de DEAE celulosa en iguales condiciones. Las fracciones que presentaron espectro de CR se juntaron, dializaron contra Tris 50 mM pH 8.0 conteniendo 1 mM EDTA y 0.1% LDAO; concentraron y sometieron a una centrifugación en gradiente continuo de sacarosa. Este paso también es común con el correspondiente del procedimiento A. Así se obtuvo una preparación de CR purificado, con espectro indistinguible del obtenido por el procedimiento B.

En la figura 11 se puede ver un esquema que describe los diferentes pasos de este procedimiento.

6.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.

El método utilizado fue el de Weber y Osborn (104) con algunas modificaciones. Es importante destacar que este método permite calcular el peso molecular de polipéptidos con una precisión de $\pm 10\%$ y con ese fin se usó en este trabajo.

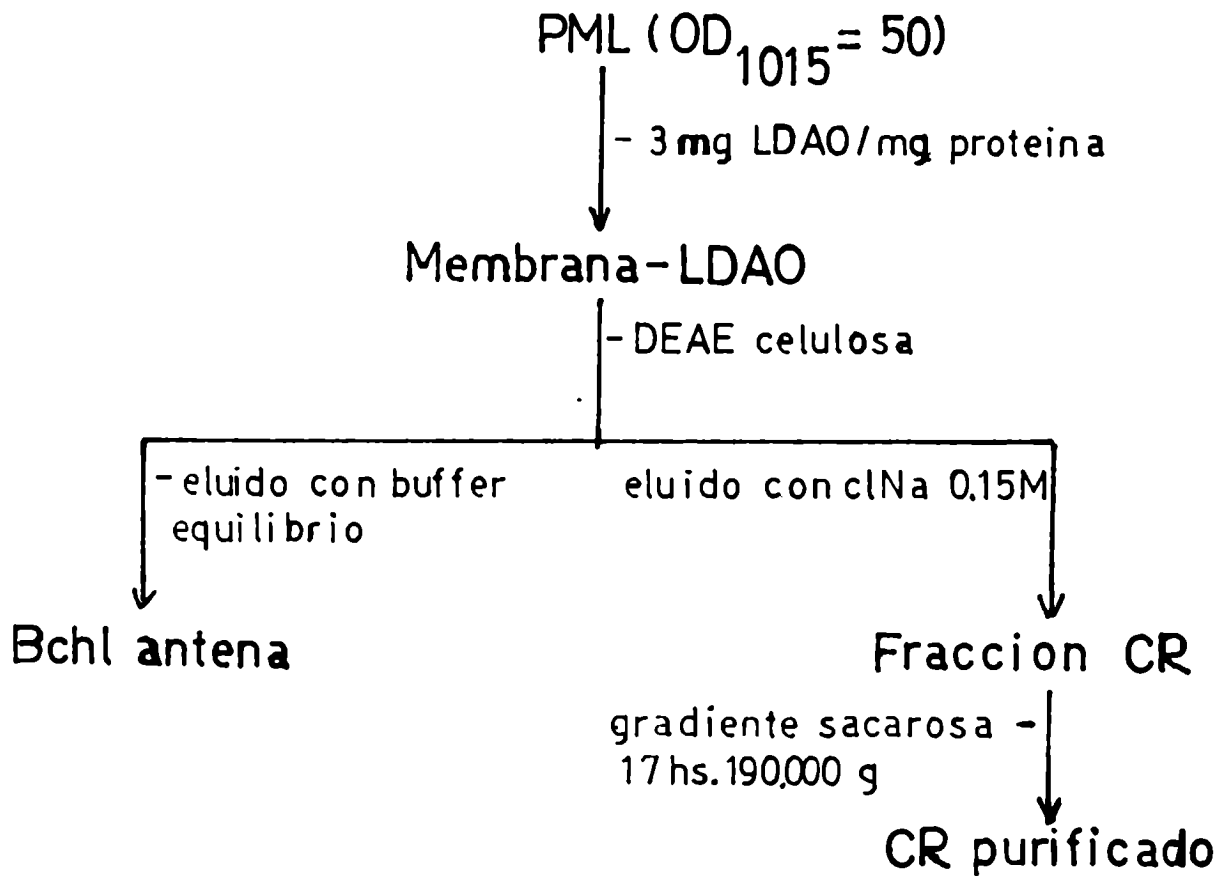


Figura 11:

Esquema de purificación del centro de reacción de Rps. viridis utilizando LDAO (Proc. C).

a.- Preparación de los geles.

Son varias las soluciones que se utilizaron para la preparación de los geles.

- Solución de acrilamida-Bisacrilamida (Solución A)

Acrilamida 22 gr

N-N'-metilen bis acrilamida 0.6 gr

Se llevó con agua destilada a 100 ml.

- Buffer de gel (Solución B)

Tris 0.1 M pH 8.0

SDS 0.2%

Esta solución es la que da la concentración final de SDS en el gel; y como se verá en RESULTADOS, según el experimento varía entre 0.1% y 2% SDS.

Al principio de esta investigación los geles utilizados, contenían PBS 0.1 M y cantidades variables de SDS en el gel (de acuerdo al método original (104)). Luego se sustituyó por buffer Tris-ClH porque se observó que se obtenía mejor resolución.

- Solución de persulfato de amonio (Solución C)

Persulfato de amonio: 4 mg/ml.

Esta solución se prepara fresca cada vez que se usa.

- N N N' N' tetrametiletilendiamina (TEMED) concentrado.

Para la preparación de los geles se mezclan las siguientes

proporciones de las soluciones stock anteriores:

Solución A	9	ml
Solución B	10	ml
Solución C	1	ml
TEMED	0.033	ml

El buffer de corrida empleado fue el buffer de gel diluído el medio con agua destilada, lo que representó la misma concentración de Tris y SDS que en el gel.

b.- Preparación de la muestra.

Las muestras de membrana ó CR fueron deslipidizadas de la siguiente forma: un volúmen de muestra se trató 2 veces con 9 volúmenes de acetona cada vez, (se comprobó experimentalmente que la acetona no extrae proteínas; con membranas ó preparaciones de CR marcadas con amino-ácidos C^{14} , no se recuperaron cuentas en el extracto acetónico), se centrifugó a 25.000 g 15 minutos, se lavó una vez con agua destilada, se centrifugó a 25,000 g 20 minutos y finalmente se resuspendió en Tris 50 mM pH 8.0.

Tratándose de membranas de bacterias ó complejos lipoproteicos de la misma, para posibilitar su penetración en el gel durante la corrida, la muestra debe ser pretratada para disociarla en subunidades más pequeñas. Dicha disociación se logró mediante el empleo de SDS y en algunos casos se complementó su efecto con otro agente disociante como el B-mercaptoetanol (ME).

En esta investigación se puso mucho énfasis, en diferentes condiciones de disociación; así se trató la muestra deslipidizada con cantidades variables de SDS (0.05%, 0.1%, 0.5% y 1%) en presencia ó no de 1% ME y se incubó a 30°C durante 60 minutos. Se agregó a cada muestra una gota de glicerol ó sacarosa y una gota de azul de bromo fenol 0.005%, usado como marcador. Se sembró entre 100 y 150 ug de proteína por gel, dependiendo de su tamaño. Las muestras fueron deslipidizadas para evitar que a concentraciones bajas de SDS se obtuvieran bandas difusas de difícil distinción.

c.- Condiciones de la corrida electroforética.

Durante la primera etapa de penetración de la muestra en el gel (para geles de 5 mm de diámetro y 7.5 cm de altura), se mantuvo una corriente constante de 3 mA por gel, y luego se aumentó a 5 mA, en estas condiciones la corrida duró aproximadamente 1.5 horas. Si se corrían geles de 7 mm de diámetro y 8 cm de altura, la corriente inicial se mantenía en 5 mA por tubo y luego se aumentaba a 8 mA, requiriendo aproximadamente 2.5 horas para finalizar la electroforesis. La corrida se efectuó a aproximadamente 5°C.

d. Tinción y distinción de los geles.

Una vez finalizada la corrida electroforética se marcó la

posición del colorante marcador con una aguja embebida en tinta china y se sumergieron en la solución colorante que se preparó disolviendo 1.25 gr de azul de Coomassie en una mezcla de 454 ml de metanol 50% v/v y 46 ml de ácido acético glacial, removiendo, si era necesario, el material insoluble por filtración a través de papel Whatman N° 1.

La tinción se realizó a temperatura ambiente durante 2 horas, se decoloraron en una solución conteniendo 7.5% v/v de ácido acético y 5% v/v de metanol.

e.- Registro de los geles antes de teñir y una vez teñidos y desteñidos.

Antes de teñir, los geles se registraron a 280 nm. Como ninguno de los espectrofotómetros que teníamos en el laboratorio poseía un equipo para registro de geles, diseñamos uno muy sencillo para adosarlo al espectrofotómetro Zeiss Modelo PMQ III.

Los geles una vez teñidos y desteñidos también se registraron a 560 nm.

f.- Determinación del peso molecular de las subunidades del centro de reacción.

La separación de polipéptidos por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de detergentes (SDS) es dependiente del peso molecular de estas cadenas. Se trata de un método útil

para determinar el peso molecular de diferentes proteínas. Para lograr estos fines fue necesario calibrar el gel con proteínas de peso molecular conocido. Las proteínas usadas fueron: seroalbúmina (PM: 67.000 daltons), ovoalbúmina (PM: 45.000 D) quimotripsinógeno A (PM: 25.000 daltons) y citocromo C (PM: 12.500 daltons). La muestra para la corrida electroforética, se pretrató en idénticas condiciones a la muestra de CR. Para cada proteína, corrida en una determinada condición, se midió la distancia de migración desde el origen y se calculó la movilidad relativa respecto del colorante usado como marcador, que se graficaron en un papel semilogarítmico en función de los pesos moleculares. Las correspondientes curvas de calibración se muestran en las figuras 12, 13 y 14.

g.- Electroforesis en gel de poliacrilamida como criterio de pureza.

Alternativamente, muestras de CR purificado fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida en un sistema no disociante, donde el complejo CR migra intacto. En este caso se disminuyó la concentración final de acrilamida al 5% y se sustituyó el SDS por LDAO en una concentración final de 0.1%.

Previamente a la corrida electroforética, la muestra se dializó contra el buffer de corrida (Tris 50 mM pH 8.0 conteniendo 0.1% LDAO) durante una noche. La electroforesis se efectuó a 5 mA por gel, en estas condiciones el CR purificado migró como

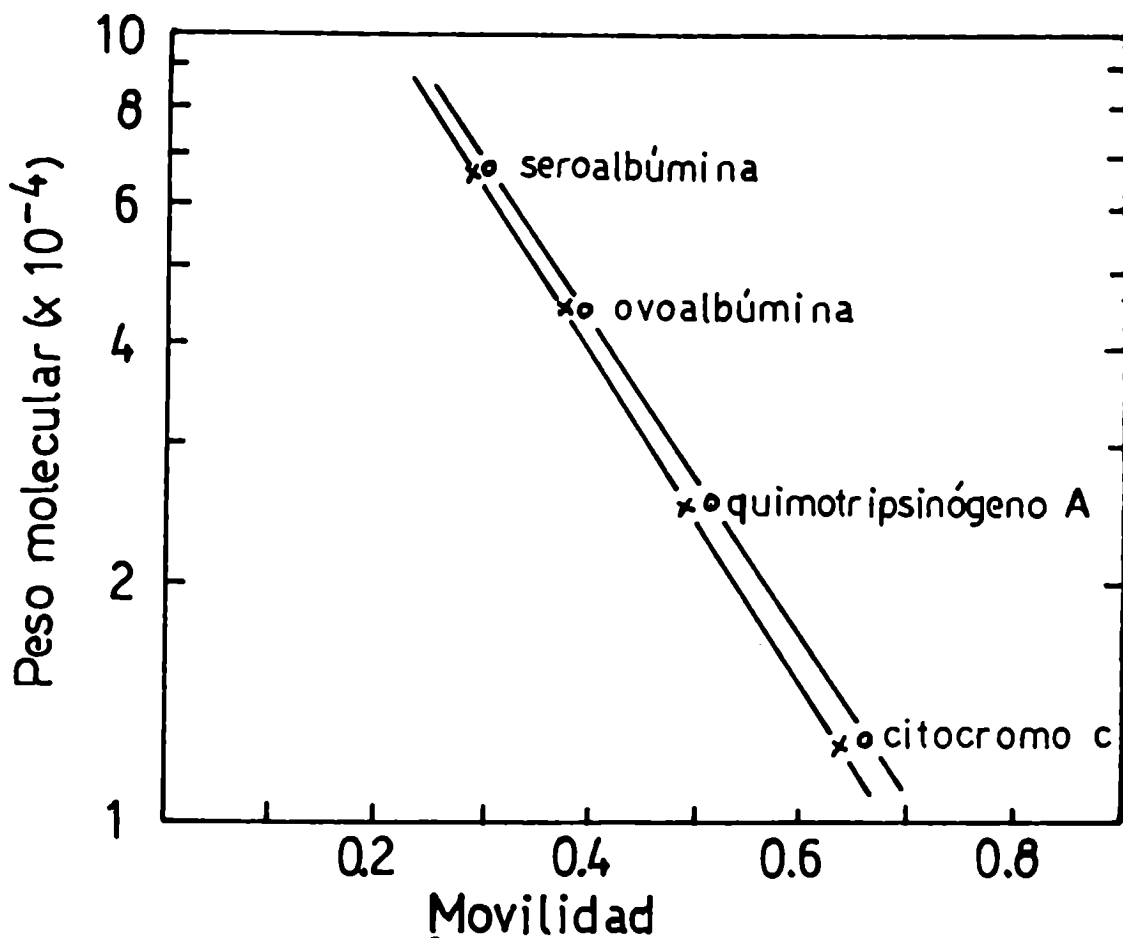


Figura 12:

Electroforesis en gel de poliacrilamida. En cada gel se sembraron 30 μ g de cada una de las siguientes proteínas puras: seroalbúmina (PM: 67.000 Daltons), ovoalbúmina (PM: 45.000 D), quimotripsinógeno A (PM: 25.000 D) y citocromo c (PM: 12.500 D). (x—x) muestra tratada con 0.05% SDS, (o—o) muestra tratada con 0.05% SDS y 1.0% ME. En ambos casos el gel y el buffer de corrida contiene 0.05% SDS.

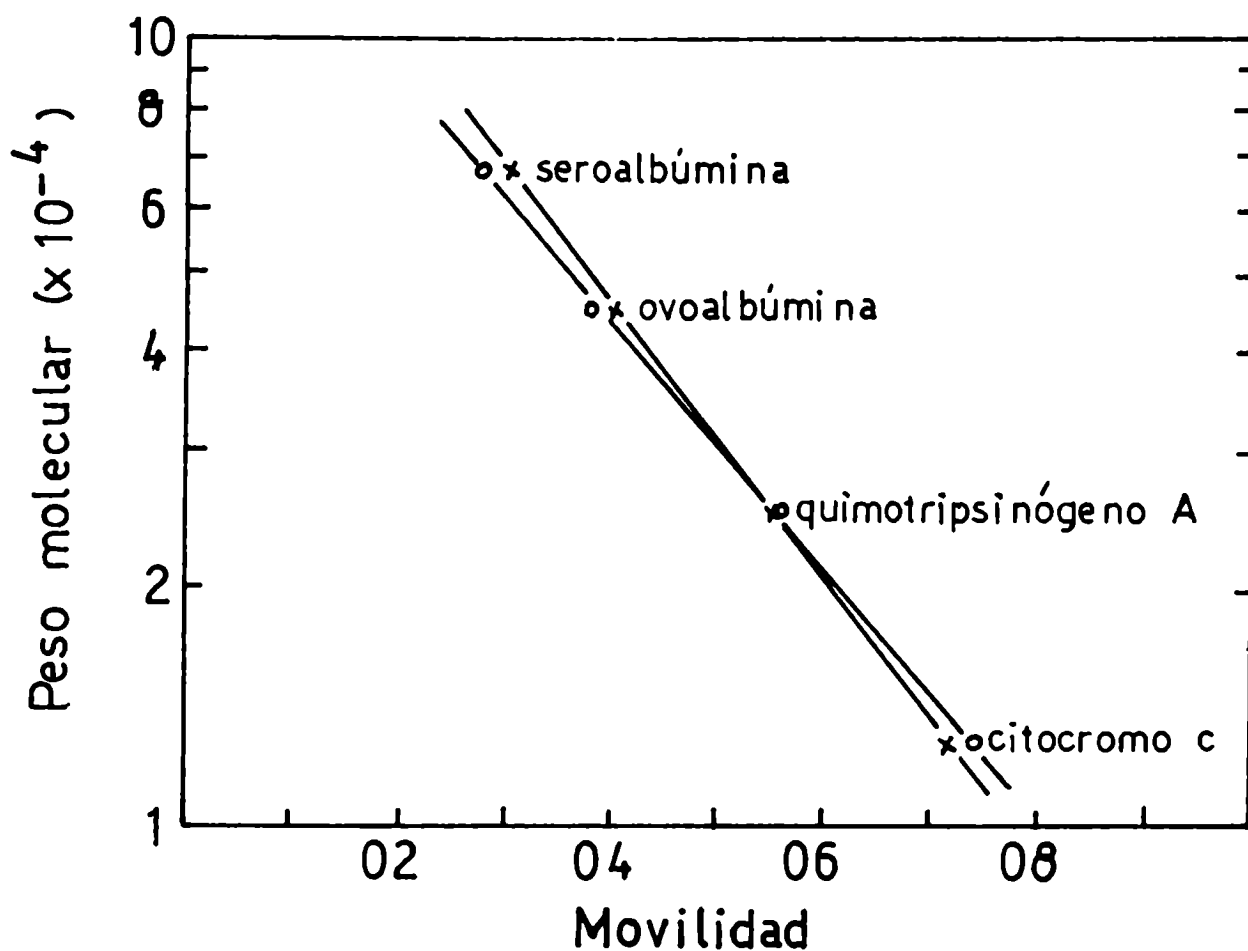


Figura 13:

Electroforesis en gel de poliacrilamida. En cada gel se sembraron 30 μ g de las mismas proteínas que en la figura 12. (x — x) muestra tratada con 0.1% SDS, (o — o) muestra tratada con 1.0% SDS y 1.0% ME. En ambos casos el gel y el buffer de corrida contienen 0.1% SDS.

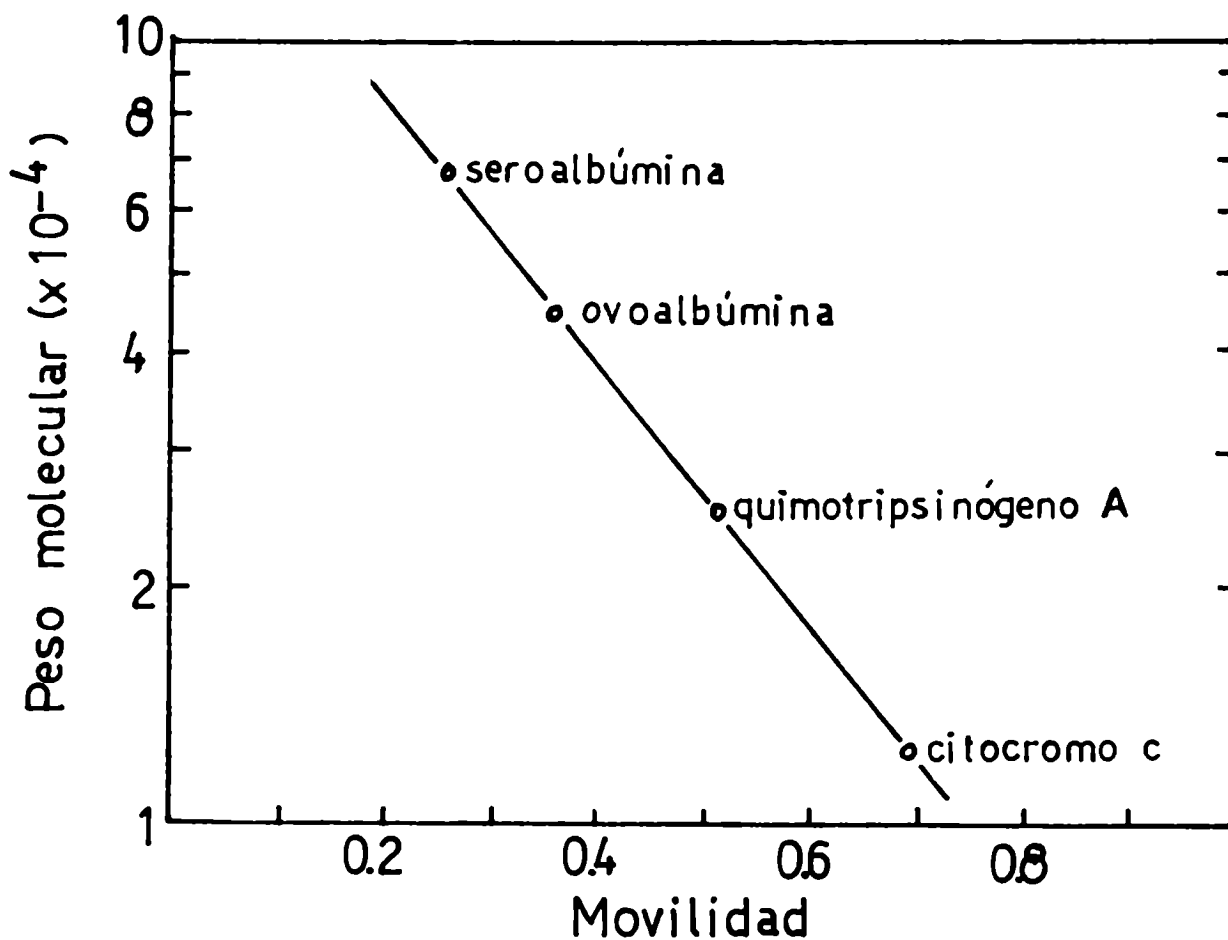


Figura 14:

Electroforesis en gel de poliacrilamida. En cada gel se embraron 30 ug de las mismas proteínas que en la figura 12. La muestra se trató con 0.5% SDS y 1.0% ME, el gel y el buffer de corrida contiene 0.5% SDS.

una única banda proteica conteniendo todo el pigmento, el tiempo necesario para recorrer las 3/4 partes del gel resultó ser aproximadamente 15 horas.

7.- Determinación del PM del complejo CR por filtración en gel.

La filtración en gel es un procedimiento cromatográfico que se caracteriza por la separación de sustancias por su tamaño molecular. Para este fin se usaron:

a.- Sepharosa 6B.

Es un gel de agarosa, que lo provee Pharmacia Fine Chemicals. Tiene un tamaño de partícula entre 40 y 210 μ y permite la separación de sustancias cuyos pesos moleculares varían entre 100.000 y 1×10^6 Daltons.

Se preparó una columna de 1 x 70 cm que se equilibró con Tris 10 mM pH 8.0, conteniendo 1 mM EDTA y 0.1% LDAO. La columna fue calibrada usando proteínas puras de PM conocido y eluidas con el mismo buffer. Se utilizaron: Tiroglobulina (PM: 480.000 D); catalasa (PM: 230.000 D) y γ globulina humana (PM: 160.000 D). Se mezclaron aproximadamente 10 mg de cada una y se dializaron contra el buffer de elución.

V_0 (volumen de exclusión) se calculó midiendo el volumen de elución de blue dextran y V_t (volumen total de la columna) midiendo el volumen de elución de DNP-alanina (dinitrofenilalanina) 6

agua tritiada. Se midieron los volúmenes de elución de cada proteína usada como marcador, y se calcularon los K_{av} (coeficiente de partición entre la fase líquida y la de gel) correspondientes, según la ecuación:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

donde V_e es el volumen de elución de cada proteína. Se graficaron los PM en función de K_{av} para cada proteína, en un papel semilogarítmico y se obtuvieron gráficos como pueden verse en la figura 15.

Las proteínas eluidas se identificaron por su absorbancia a 280 nm. La catalasa se midió, además, por su actividad en descomponer el H_2O_2 en O_2 y H_2O (105). El blue dextran y DNP-alanina se identificaron por sus absorbancias a 600 y 420 nm respectivamente, en el caso de usar agua tritiada, el V_t se determinó midiendo la radioactividad de las fracciones. En una cromatografía separada, en la misma columna, se corrió el CR purificado mezclado con Blue dextran y agua tritiada (para controlar nuevamente V_o y V_t). La elución del CR se siguió por su absorción a 280 nm y a 835 nm, se midió el V_e , se calculó K_{av} y de la curva de calibración se determinó el peso molecular del complejo.

b.- Bio-gel P300.

Es un gel de poliacrilamida que lo provee Bio Rad Laborato-

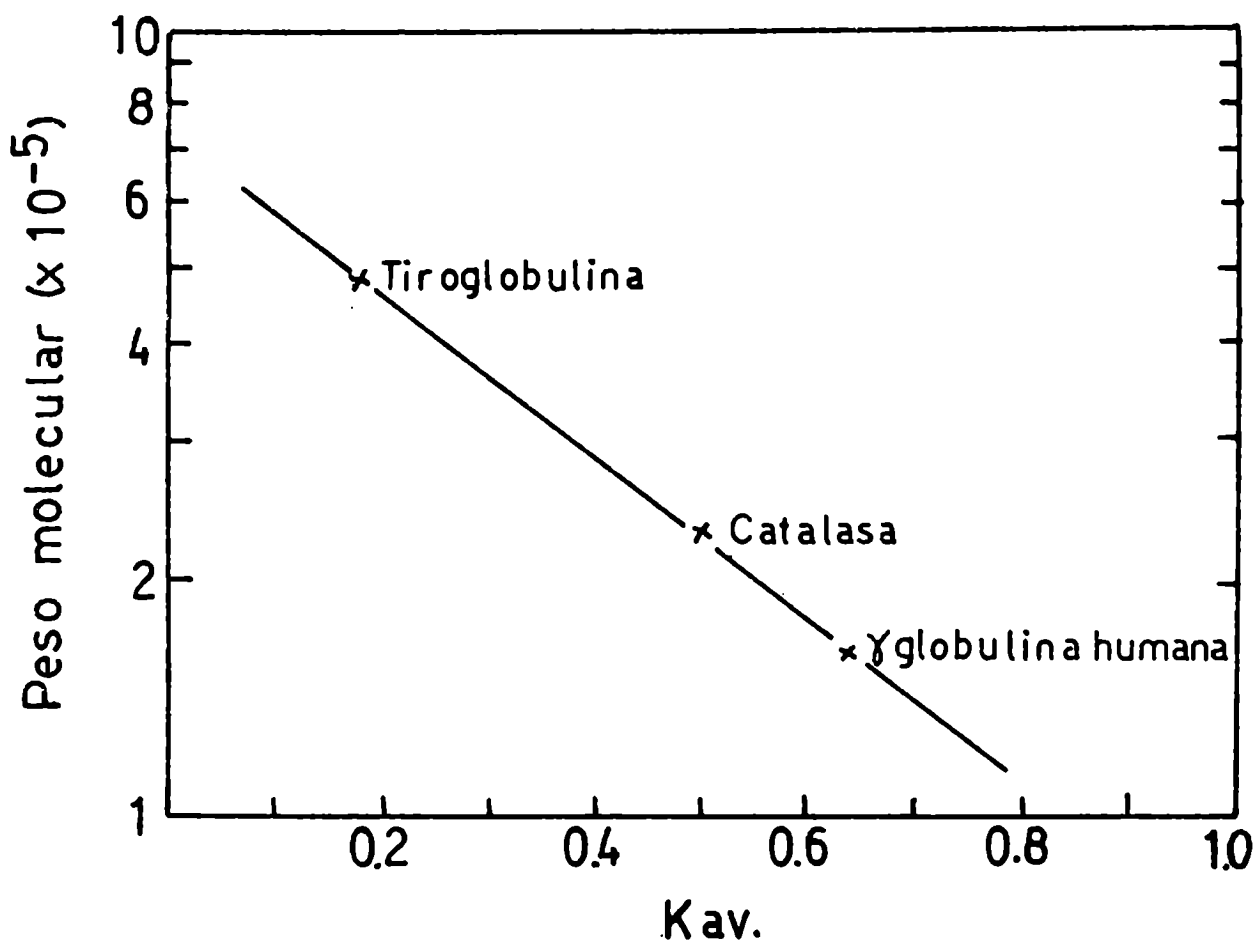


Figura 15:

Filtración en gel a través de Sepharosa 6B. La muestra contiene 10 mg de cada una de las siguientes proteínas: Tiroglobulina (PM: 480.000 D), catalasa (PM: 230.000 D), y γ globulina humana (PM: 160.000 D). Se midió usando blue dextran y Vt, usando agua tritiada.

ries, como un polvo seco, que luego de la adición de agua se hincha espontáneamente para formar las partículas de gel que son usadas en cromatografía. Tiene un tamaño de partícula de 75-150 μ y un rango de separación de pesos moleculares entre 100.000 y 400.000 Dalton. Se preparó una columna de 1 x 70 cm con este gel, se eluyó con Tris 50 mM pH 8.0 conteniendo 1 mM EDTA y 0.1% LDAO. La columna fue calibrada usando proteínas puras de PM conocidos y eluidas con el mismo buffer. Se usaron 10 mg de cada una de las siguientes proteínas: Catalasa (PM 230.000 D); γ Globulina humana (PM: 160.000 D) y Albúmina de suero bovino (PM: 67.000 D), como standards. Antes de la cromatografía se dializaron contra el buffer de elución. Se calcularon V_0 y V_t igual que en el caso anterior, la curva de calibración obtenida se ve en la figura 16. Las proteínas eluidas se identificaron de la misma manera que en el caso anterior y de igual forma se calculó el peso molecular del complejo.

8.- Cromatografía en capa delgada.

Para preparar las placas se usó silicagel G, en capas homogéneas de un espesor aproximado de 500 micrones. Una vez preparadas las placas, se dejaron secar al aire y luego se activaron, por calentamiento durante 30 minutos a 120°C. Por este procedimiento se separaron lípidos y quinonas.

a.- Determinación de lípidos.

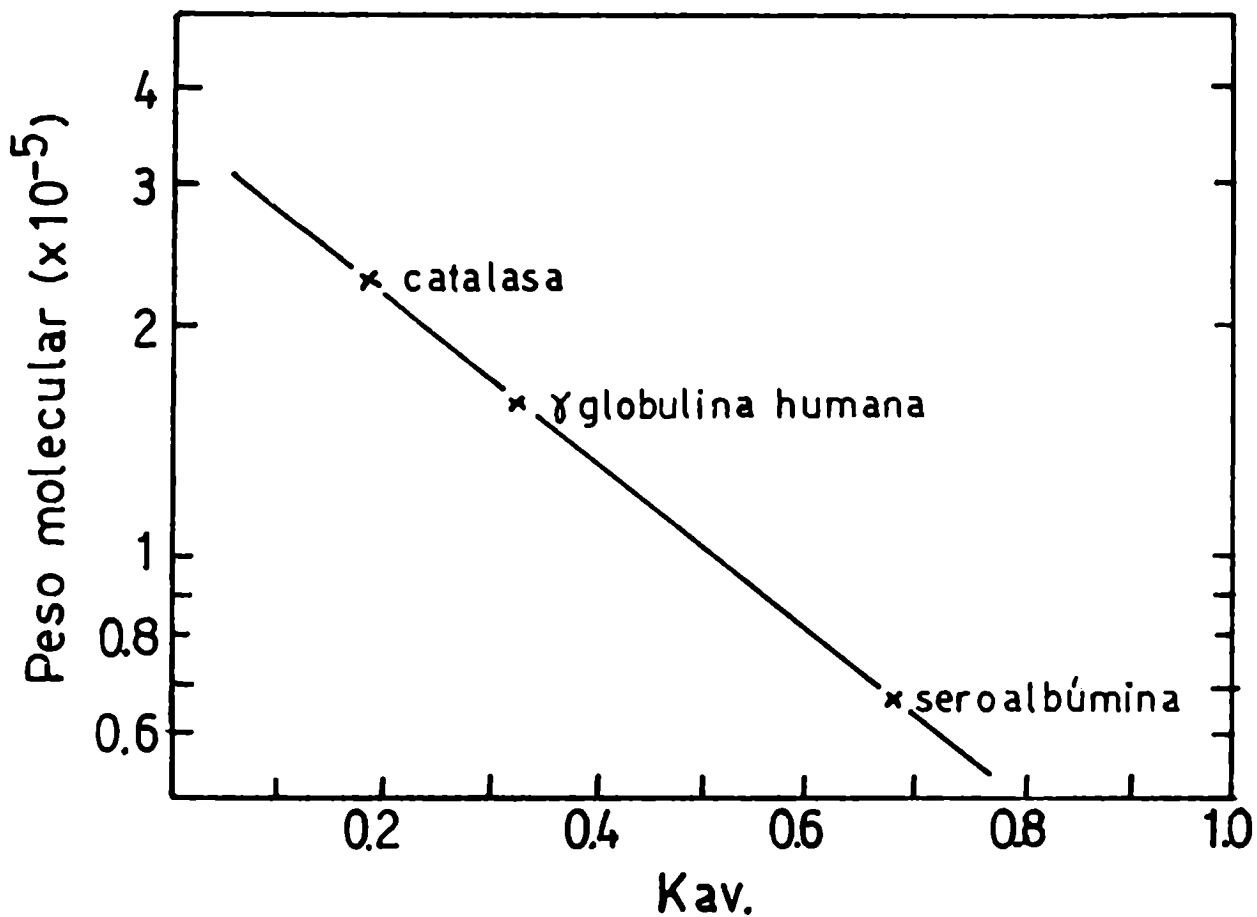


Figura 16:

Filtración en gel a través de Bio gel P300. La muestra contiene 10 mg de cada una de las siguientes proteínas: catalasa (PM: 230.000 D), γ globulina humana (PM: 160.000 D) y albúmina de suero bovino (PM: 67.000 D). Se midió usando blue dextran y Vt, usando agua triada.

Los lípidos se extrajeron por el método de Blight y Dyer (106).

La muestra se sembró en las placas ya activadas en forma de punto y se sometió a cromatografía bidimensional de acuerdo al procedimiento descrito por Nichols (107). Se usó como primer solvente de desarrollo: Cloroformo; metanol; ácido acético; agua; 250: 74: 19: 3 y como 2do. solvente: Cloroformo; Metanol; Hidróxido de amonio 7M; 230: 90: 15. Los diferentes lípidos se identificaron con distintos reactivos:

- Para lípidos que contienen grupos amino se usó ninhidrina al 0.1% en acetona.
- Para lípidos que contienen fósforo se utilizó el reactivo descrito por Vaskowsky y Kotsketsky (108).
- Para lípidos que contienen colina se usó el reactivo de Dragendorff modificado (descrito por Bregoff y colaboradores (109)).

b.- Determinación de quinonas.

En este caso la extracción de lípidos de la membrana se hizo de la siguiente forma: 1 volúmen de muestra se trató con 4 volúmenes de metanol y 5 volúmenes de éter de petróleo. Se separó la capa superior, etérea; la inferior se reextrajo con 3 volúmenes de éter de petróleo. Los extractos etéreos se juntaron, se lavaron con 2 volúmenes de metanol y se evaporaron bajo vacío. Los lípidos se tomaron en un pequeño volúmen de cloroformo y se analizaron por cromatografía en capa delgada. La muestra disuelta

en cloroformo se sembró en forma de banda en placas de silicagel G de 20 x 20 cm, y se corrieron en una cuba conteniendo benceno, se dejó correr el solvente aproximadamente 45 minutos, se secó la placa al aire y luego se reveló la posición de las quinonas usando una solución de azul de metileno 1 mM, reducida con cinc y ácido sulfúrico.

Sobre una placa que se corrió paralela a la anterior se reveló de esta manera la posición de los compuestos capaces de oxidar el azul de metileno, luego se raspó el material que se encontraba en la misma posición que las manchas de azul de metileno oxidado. Así se recogió la sílica gel que contenía las diferentes quinonas y se reextrajo tres veces con cloroformo. Cada fracción se recromatografió en placa delgada usando benceno: éter de petróleo (1:1) como solvente de desarrollo. Las zonas reactivas se extrajeron 3 veces con alcohol etílico y se registraron en el UV (entre 220 y 320 nm), antes y después de la adición de un pequeño cristal de borohidruro de sodio. Se tomó la diferencia de absorbancia a 275 nm y se usó como coeficiente de extinción molar un valor de 12.

c.- Composición de pigmentos del centro de reacción.

La determinación cualitativa de la Bchl y de la Bpheo del CR se realizó también por cromatografía en placa delgada por observación visual según el procedimiento descrito por Reed y Peters (16).

La extracción de los pigmentos del CR se realizó según el método de Blight y Dyer (106).

10.- Cromatografía en papel

Mediante este procedimiento se separaron distintos componentes de la fracción acuosa del extracto de levadura, para probar su efecto sobre el fenómeno de repigmentación de células de Rps. viridis crecidas en medio sin extracto de levadura.

La fracción acuosa del extracto de levadura obtenido luego de la extracción de sus lípidos por el método de Blight y Dyer (106), se sometió a una cromatografía descendente en papel. Se sembró la muestra en papel Watman N° 1. El solvente de desarrollo usado fue: Butanol; Acido acético; H₂O; 4: 1: 5. Luego de la cromatografía, se revelaron bajo luz UV, 4 zonas con diferente fluorescencia, cada zona se cortó y eluyó con una mezcla de etanol; NH₃ 1%; 2: 1:, mediante 5 extracciones de 2 ml cada una. Las diferentes fracciones se evaporaron en un evaporador rotatorio hasta aproximadamente 2,6 ml. Cada fracción se agregó al medio de cultivo sin extracto de levadura (en proporción adecuada, de acuerdo a la concentración de extracto de levadura del medio de Hutner), se inoculó con células crecidas en condiciones de bajo contenido de pigmento (crecidas en medio sin extracto de levadura) y se incubó a 30°C en luz, de esta manera se probó su efecto en el fenómeno de repigmentación.

Como resultado de experimentos de este tipo se vió que sólo una de las 4 fracciones (la 2da. desde el lugar de siembra) pro-

ducía el efecto buscado. Esta fracción se sometió a nuevas cromatografías en papel Watman N° 3, en este caso ascendente, usando como solvente de desarrollo: Propanol; NH_3 1%; 2: 1. Se observaron 4 zonas que revelaron fluorescencia bajo una lámpara UV, de las cuales la 2da. desde el lugar de siembra, con fluorescencia amarillo-verdoso intenso, resultó ser útil para el propósito perseguido. Esta fracción se sometió a sucesivas cromatografías ascendentes en papel Watman N° 3 desarrolladas en el último solvente. En cada paso se probó el efecto de las distintas fracciones sobre el proceso de repigmentación. En el mismo sistema se corrieron como standards: Acido fólico; ácido p-amino benzoico; Serina; Metionina; Biopterina; Xantopterina; Fosfato de piridoxal; Acido pantoténico y se comparó el Rf de las fracciones que producían repigmentación de las células.

11.- Determinación de ácidos grasos.

De la muestra cuyos ácidos grasos se quería determinar se extrajeron los lípidos por el método de Blight y Dyer (106).

El extracto lipídico se llevó a sequedad bajo vacío y se resuspendió en hidróxido de potasio 40% w/v en etanol, se hirvió durante una hora y los lípidos insaponificables se extrajeron con éter etílico. La solución alcohólica-acuosa se llevó a pH ácido y los ácidos grasos se extrajeron lavándolos nuevamente con éter etílico. Los ésteres metílicos se prepararon hirviendo 2 horas con una mezcla de ácido 1.5% en metanol w/v. Los ésteres metílicos fueron finalmente tomados en éter etílico y analizados por cromatografía.

tografía en fase gaseosa. Por carecer nosotros de un cromatógrafo de gases, esta determinación la realizó el Dr. Pedro Cattáneo en su laboratorio de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

12.- Determinación de ornitina.

La ornitina fue determinada cuantitativamente según el procedimiento descrito por Chinard (110).

Con ornitina pura se fabricó una curva standard, como puede verse en la figura 17. Este método permitió detectar entre 10 y 100 μ moles de ornitina.

13.- Determinación de fósforo inorgánico.

El fósforo inorgánico se determinó en el extracto lipídico total, usando el procedimiento de Bartlett (111).

Con una solución de fosfato de concentración conocida se hizo una curva standard, y se graficó la densidad óptica a 830 nm en función de μ moles de fósforo. Con este método se pueden apreciar entre 0.02 y 1.2 μ moles de Pi, como se puede ver en la curva standard que se muestra en la figura 18.

14.- Determinación de bacterioclorofila.

Se han empleado 2 métodos diferentes para la determinación

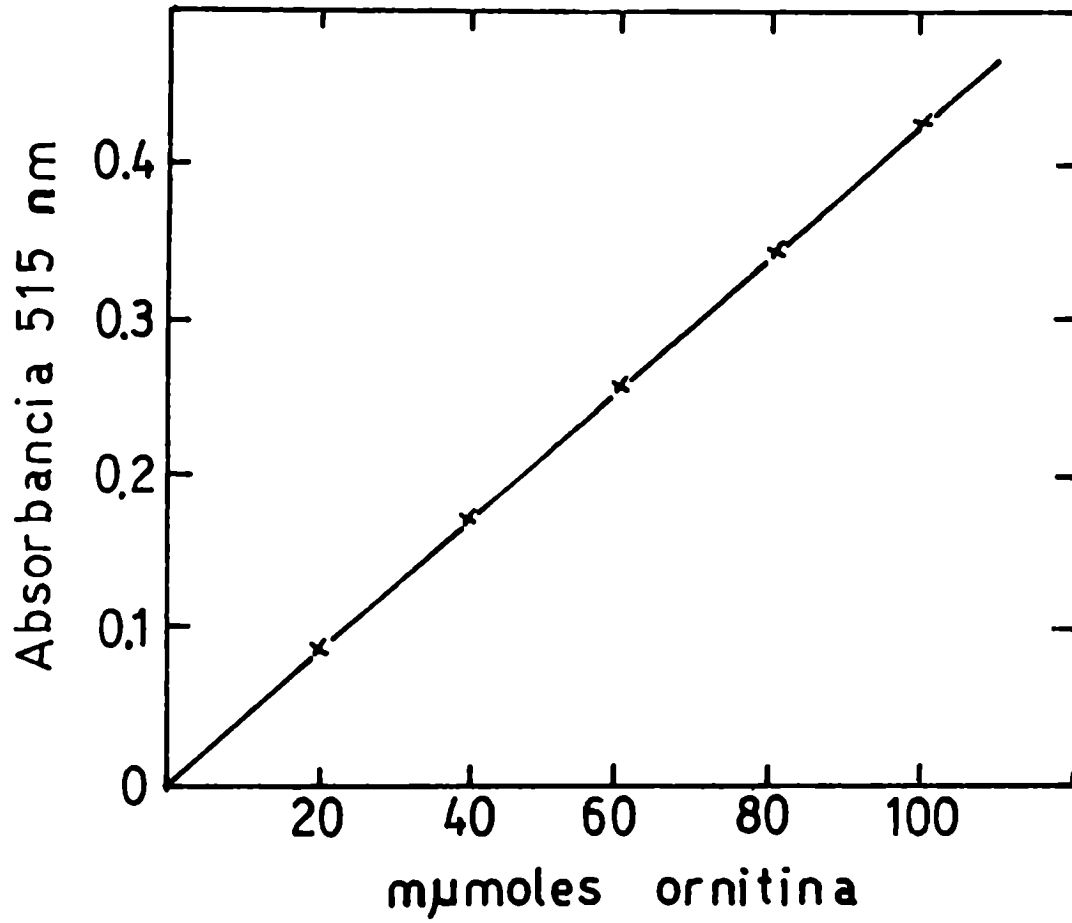


Figura 17:
Curva standard de ornitina.

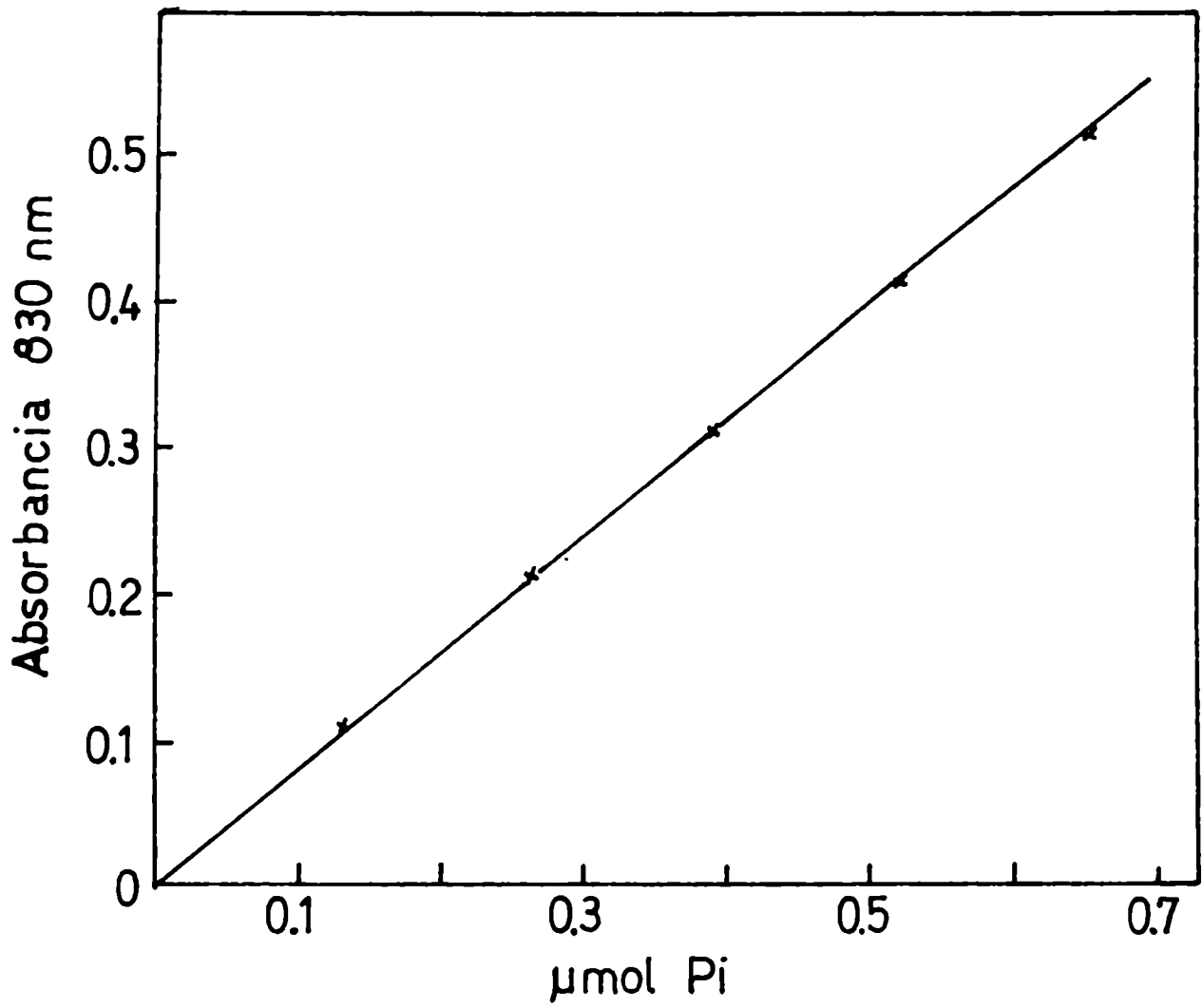


Figura 18:
Curva standard de fosfato.

de Bchl.

- Método A:

Este método consistió en la extracción del pigmento y su determinación espectrofotométrica, utilizando un $E_M = 75$ a 772 nm, tal como fue descrito por Clayton (7).

Es importante recordar que la Bchl solubilizada extraída en los solventes orgánicos es muy sensible a la luz; por lo tanto, todo el proceso, incluyendo la extracción, la centrifugación de las proteínas y la lectura del extracto en el espectrofotómetro, no debe llevar más de 5 minutos, y además debe ser protegido de la luz, para evitar la fotooxidación.

Para efectuar la conversión a μg , se supuso un valor de 1.000 para el peso molecular de la Bchl.

- Método B:

El segundo método, se basó en la determinación de la Bchl b leyendo en un espectrofotómetro la absorbancia máxima del pigmento a 1.015 nm y usando en este caso el coeficiente de extinción molar (E_M) cuyo valor determinado por Thornber y colaboradores (99) es de 10^5 .

15.- Determinación de proteínas.

Para ésto se usó el método de Lowry (112).

Las proteínas se precipitaron con acetona-metanol 7:2 ó con acetona (concentración final 90%), se centrifugó y el precipi-

tado se reextrajo con el mismo solvente, el precipitado se lavó con agua, se centrifugó a 22.000 g y se resuspendió en agua homogeneizándolo en un "potter" de vidrio con émbolo de teflón. De esta suspensión se tomó una alicuota con la que se determinó la concentración de proteínas. De esta manera se evita la interferencia de los pigmentos que se extraen en el sovente orgánico.

Con una solución de albúmina de suero bovino (BSA) 0.02% en agua destilada, se construyó una curva patrón.

16.- Determinación de la radioactividad.

Cuando se purificó CR a partir de células de Rps. viridis crecidas en presencia de amino-ácidos marcados (C^{14}) todo el procedimiento de purificación se siguió además por la marcación en C^{14} de las proteínas.

El líquido de centelleo usado se preparó de la siguiente manera:

- Solución A.

PPO 4 gr.

POPOP 0.3 gr.

Se llevó a 1 litro con tolueno.

- Solución B.

Tritón X 100 puro.

A 550 ml de la solución A se agregaron 250 ml de la solución B.

RESULTADOS

A.- Algunos factores que influyen el estado de las membranas de Rps. viridis in vitro.

1.- Centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa.

a.- Efecto sobre PMC:

Se cosechan las células de Rps. viridis, crecidas en medio de Hutner, se resuspenden en PBS 10 mM pH 7.2, se sonicán y se obtiene la PMC, que se somete a una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa durante 12 hs. a 190.000 g.

Una vez transcurrido el tiempo de centrifugación se fraccionan los tubos recogiendo 3 gotas por fracción, lo que representa un volumen de 0.09 ml. 0.05 ml de cada fracción se diluyen con 0.65 ml de PBS 10 mM pH 7.2 se mide su absorbancia a 260, 280 y 1015 nm, y se obtienen así los perfiles de absorbancia en función del número de fracciones, que se muestran en la figura 19, así como también un esquema del tubo luego de la centrifugación.

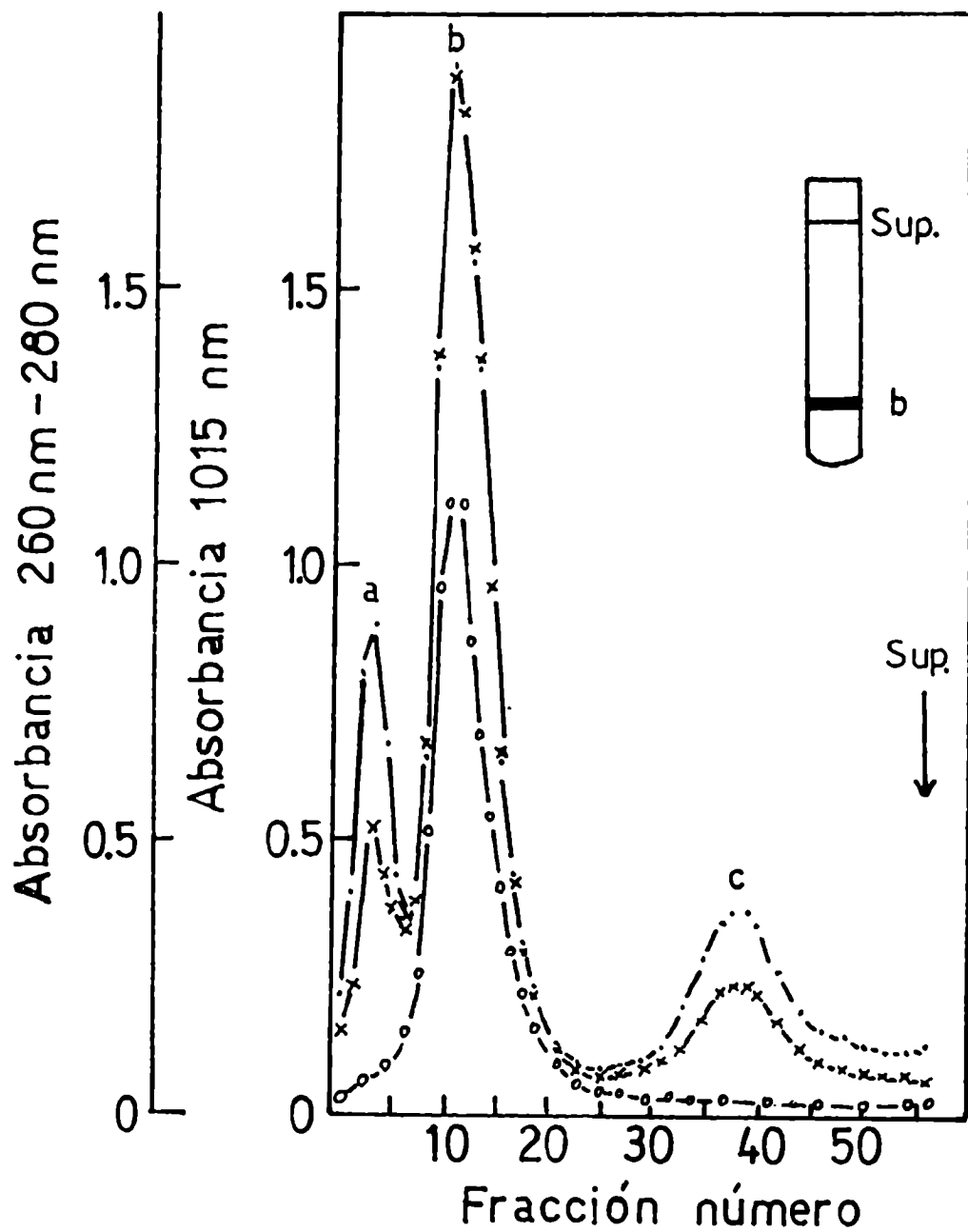


Figura 19:

Centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa de PMC. Corrida 12 hs. a 190.000 g en el rotor SW39. (o—o) Absorbancia a 1015 nm; (·—·) Absorbancia a 260 nm; (x—x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

Se vé la presencia de una única banda pigmentada (banda b) y 2 bandas adicionales con absorbancia en el UV; la banda a tiene una relación de absorbancia OD260nm/OD280nm de 1.7 lo que hace suponer que contenga ribosomas y la banda c, cuya relación de absorbancia OD260nm/OD280nm es de 1.56 sugiere la presencia de ácidos nucleicos.

La presencia de una única banda pigmentada indica que las fracciones subcromatofóricas obtenidas de la membrana de Rps. viridis tienen igual densidad.

b.- Efecto sobre la PMC, lavada con PBS 10 mM pH 7.2.

A partir de células rotas por sonicación se prepara PMC, se lava con PBS 10 mM pH 7.2, y se somete al mismo gradiente de sacarosa anterior.

También en este caso se obtiene una única banda pigmentada cuya posición en el tubo de centrifuga coincide con la mostrada en la figura 19 para la PMC.

El perfil de absorbancia en función del número de fracciones y el esquema del tubo de centrifuga luego de la centrifugación se muestra en la figura 20.

La banda a mantiene la misma relación de absorbancia OD260nm/OD280nm, que en el experimento anterior. Se observa además ausencia de la banda c lo que es lógico debido al lavado exhaustivo de las membranas.

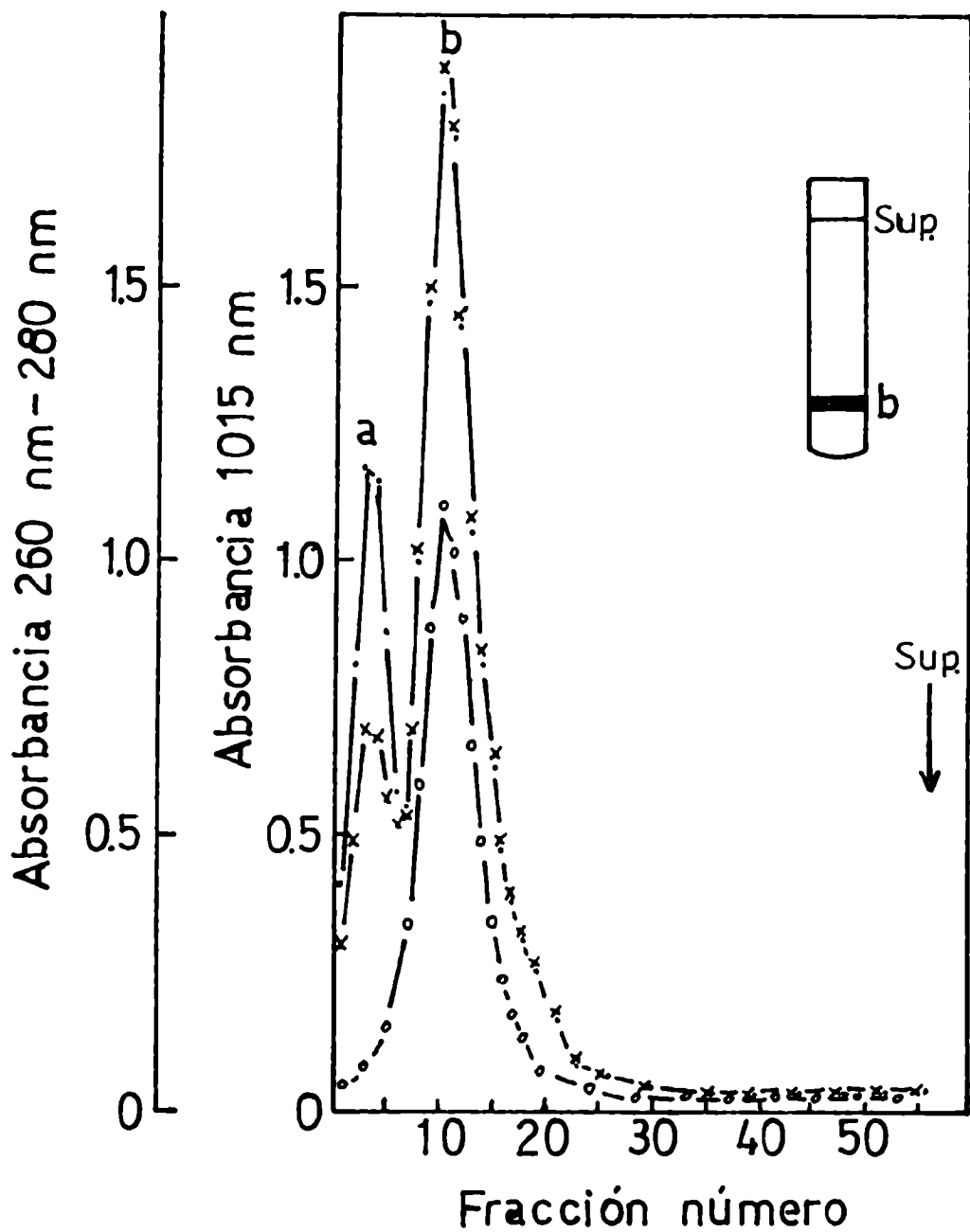


Figura 20:

Centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa de PMC, lavada con PBS 10 mM pH 7.2. Corrida 12 hs. a 190.000 g en el rotor SW39. (o—o) Absorbancia a 1015 nm, (•—•) Absorbancia a 260 nm, (x—x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

2.- Corto tiempo de centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa.

a.- Efecto sobre PMC, dializada contra PBS 10 mM pH 7.2.

Cuando la PMC dializada exhaustivamente contra PBS 10 mM pH 7.2, durante 48 hs., se centrifuga a alta velocidad (190.000 g) por corto tiempo (60 minutos), se obtienen fracciones que tienen diferentes valores de S.

El gradiente utilizado es el descrito en MATERIALES Y METODOS.

Se observa la presencia de 3 bandas pigmentadas. El perfil de absorbancia en función del número de fracciones y el esquema del tubo luego de la centrifugación se muestra en la figura 21.

Aquí también se observa la presencia, en la parte superior del gradiente de una banda correspondiente a ácidos nucleicos puesta en evidencia por la relación de absorbancia OD_{260nm}/OD_{280nm} de 1.55.

Es importante destacar que las 3 fracciones pigmentadas detectadas (bandas 1, 2 y 3) tienen una relación de absorbancias, OD_{280nm}/OD_{1015nm} , que están comprendidas entre 1.07 y 1.16, la regularidad en estos valores indica un contenido específico similar de Bchl para las diferentes fracciones subcromatofóricas pigmentadas.

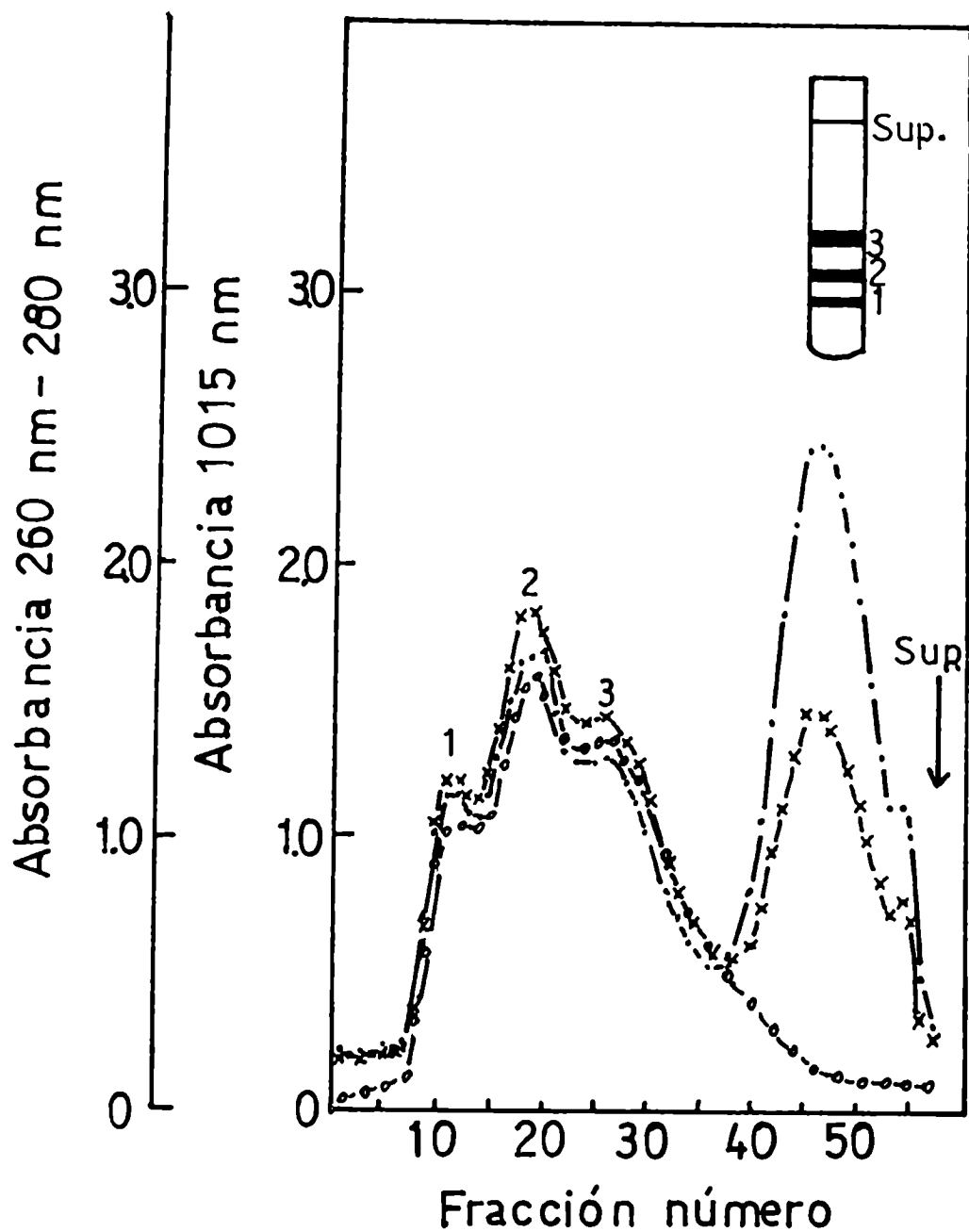


Figura 21:

Centrifugación de PMC, previamente dializada contra PBS 10 mM pH 7.2, en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (o—o) Absorbancia a 1015 nm. (•—•) Absorbancia a 260 nm, (x—x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

b.- Efecto sobre PMC, lavada con PBS 10 mM pH 7.2

Cuando la membrana se lava con PBS 10 mM pH 7.2, al centrifugar a alta velocidad, por corto tiempo, se obtiene una acumulación de la Bchl en una única banda. En la figura 22 se muestra el perfil de absorbancias en función del número de fracciones.

El hecho que se obtenga una única banda pigmentada, indica que la separación del sobrenadante, por lavado de la membrana, produciría una agregación de las subfracciones cromatofóricas que se obtienen cuando no se lava la membrana. Además la relación de absorbancias OD_{280nm}/OD_{1015nm} aumenta a 1.67 lo que es consistente con una agregación de las subfracciones. El efecto del lavado de la membrana con PBS y no de la diálisis de las mismas, sobre el fenómeno de agregación se vé afirmado por el experimento siguiente en el cual las membranas se dializan contra agua destilada; para verificar que no es la presencia de iones la responsable de mantener las membranas desagregadas.

c.- Efecto sobre PMC dializada contra agua destilada.

En este caso se obtienen resultados muy semejantes a los descritos en el experimento anterior (dializada contra PBS).

También aquí se observa la presencia de 3 bandas pigmentadas con relaciones de absorbancias OD_{280nm}/OD_{1015nm} , semejantes a las obtenidas cuando la PMC es dializada contra PBS. El perfil de absorbancias en función del número de fracciones se muestra en la fi-

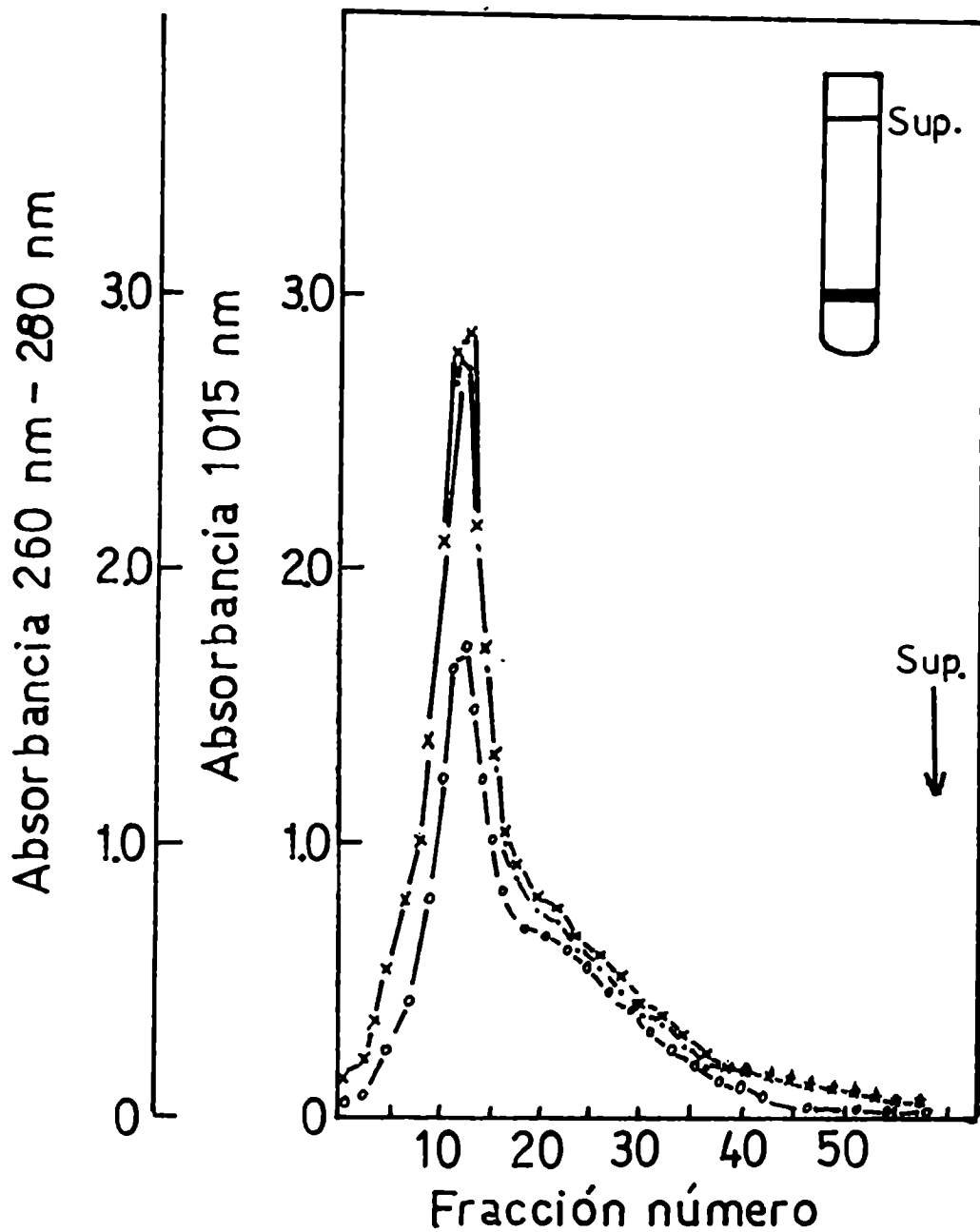


Figura 22:

Centrifugación de PMC, lavada exhaustivamente con PBS 10 mM pH 7.2, en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (o—o) Absorbancia a 1015 nm, (·—·) Absorbancia a 260 nm, (x—x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

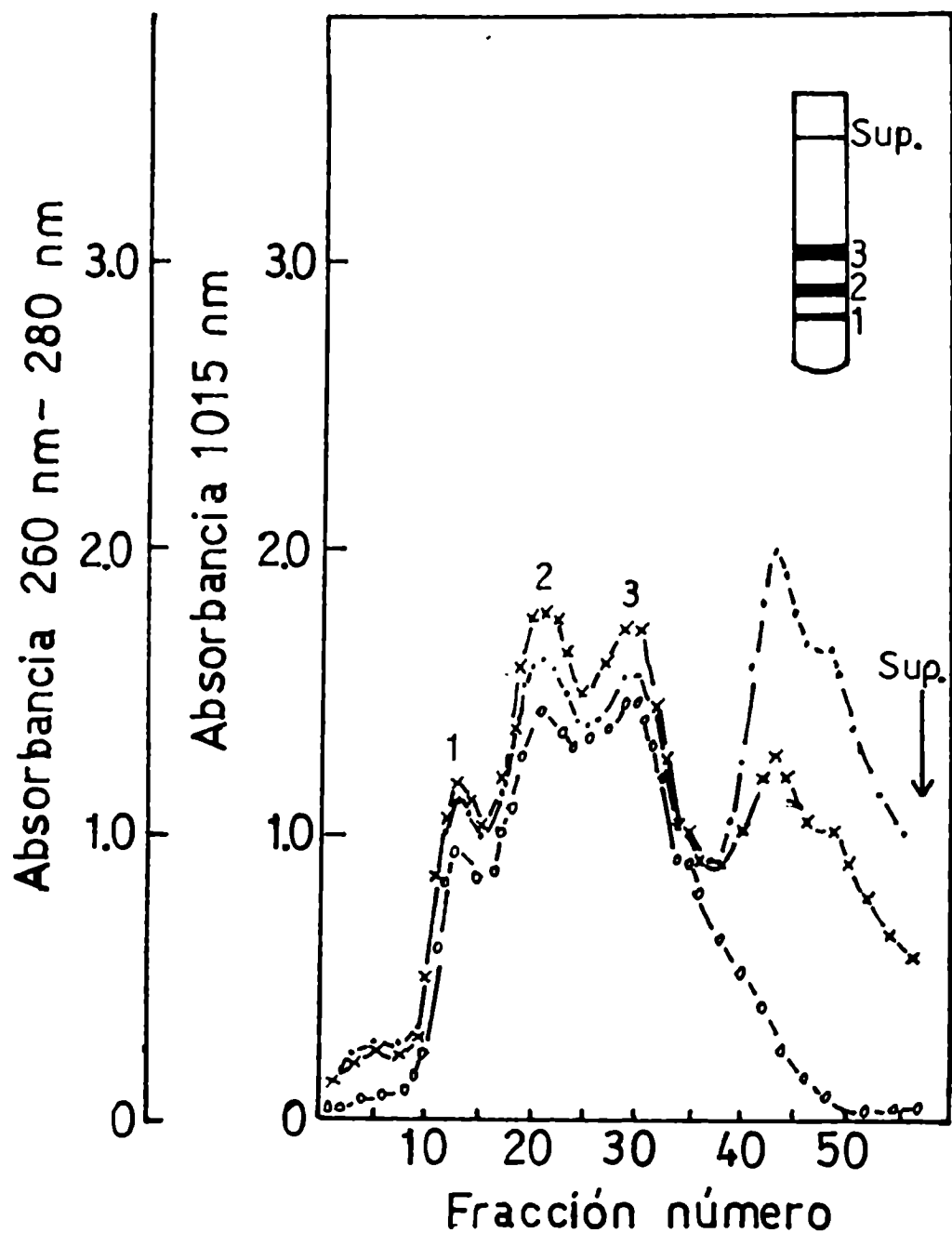


Figura 23:

Centrifugación de PMC previamente dializada contra agua destilada, en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (○—○) Absorbancia a 1015 nm, (·—·) Absorbancia a 260 nm, (×—×) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

gura 23, donde se puede ver que no se produce agregación, sino por el contrario hay un pequeño, pero reproducible incremento en la cantidad de la banda 3, que es la más liviana de las bandas pigmentadas.

También se observa aquí; la presencia de ácidos nucleicos en la porción superior del gradiente.

d.- Efecto sobre PMC, lavada con Tris-Mg²⁺.

Cuando las membranas se lavan con Tris-50mM pH 8.0, conteniendo 10^{-2} M Mg²⁺, y luego se centrifuga en un gradiente de sacarina por corto tiempo, también se produce el fenómeno de agregación.

El perfil de absorbancia en función del número de fracciones y el esquema del tubo de gradiente se muestran en la figura 24, donde se puede ver, comparando con la figura 22, que la posición de la banda pigmentada es ligeramente diferente, pero mantiene la misma relación de absorbancia OD_{280nm}/OD_{1015nm} .

e.- Efecto sobre PMC, dializada contra Tris-Mg²⁺.

Si la PMC se dializa contra Tris 50 mM pH 8.0, conteniendo 10 mM Mg²⁺, también se observa agregación, como puede verse en figura 25. También en este caso, como en los anteriores donde se prueba diálisis de la PMC, se observa una banda no pigmentada en la parte superior del gradiente, que por su relación de absorbancias OD_{260nm}/OD_{280nm} corresponde a ácidos nucleicos.

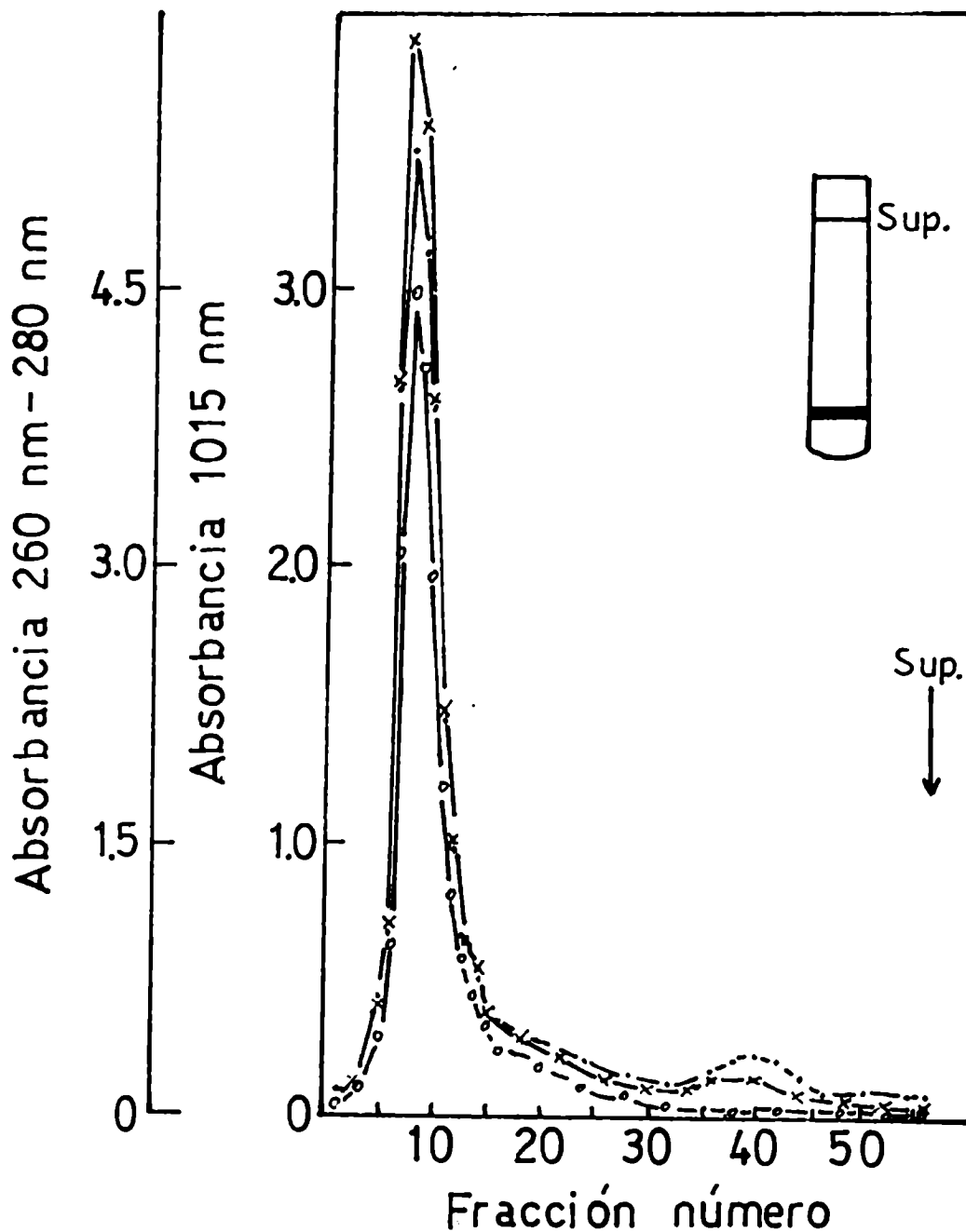


Figura 24:

Centrifugación de PMC, lavada con Tris 50 mM pH 8.0, 10^{-2} M Mg^{2+} , en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (o—o) Absorbancia a 1015 nm, (•—•) Absorbancia a 260 nm, (x—x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

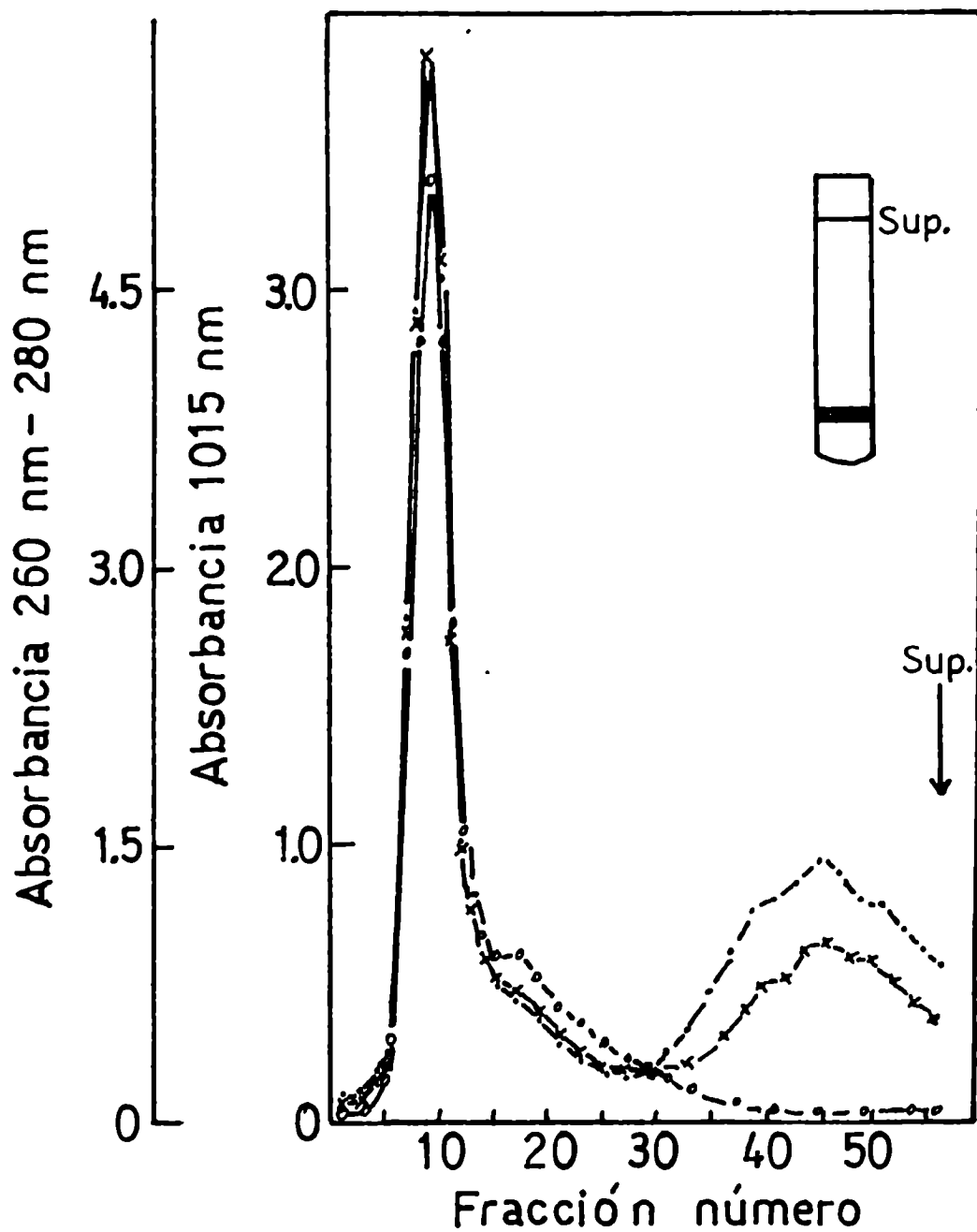


Figura 25:

Centrifugación de PMC, dializada contra Tris 50 mM pH 8.0, 10^{-2} M Mg^{2+} , en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (°—°) Absorbancia a 1015 nm, (•—•) Absorbancia a 260 nm, (×—×) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

La posición de la banda pigmentada en este caso, coincide con la obtenida en el experimento donde se lavó la membrana con Tris-Mg²⁺ y la relación de absorbancias OD_{280nm}/OD_{1015nm} es del mismo orden.

f.- Efecto del lavado de la membrana con proteínas puras.

Para investigar la razón por la cual las proteínas del sobrenadante afectan la agregación de las fracciones de membrana, se probó el efecto, sobre el proceso de agregación, del lavado de la membrana con 2 proteínas puras que tienen muy diferentes puntos isoeléctricos (PI).

Para este fin se usó citocromo c, de corazón de caballo (Sigma; Tipo VI) cuyo PI es de 11.7 y albúmina de suero bovino (BSA) con un PI de 4.6-4.8. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 26 y 27.

El citocromo c produce agregación, y si comparamos la figura 26 con la figura 24 (posición de la banda pigmentada) vemos que su efecto es muy similar al efecto del Mg²⁺.

En cambio BSA, (figura 27) tiene un efecto completamente diferente, manteniendo la membrana en un estado más desagregado, como puede observarse por la aparición de las 3 bandas pigmentadas características de la membrana que no ha sido lavada.

Las concentraciones de las proteínas puras que se usaron en estos experimentos, fueron iguales a las concentraciones de proteínas del sobrenadante en cada caso.

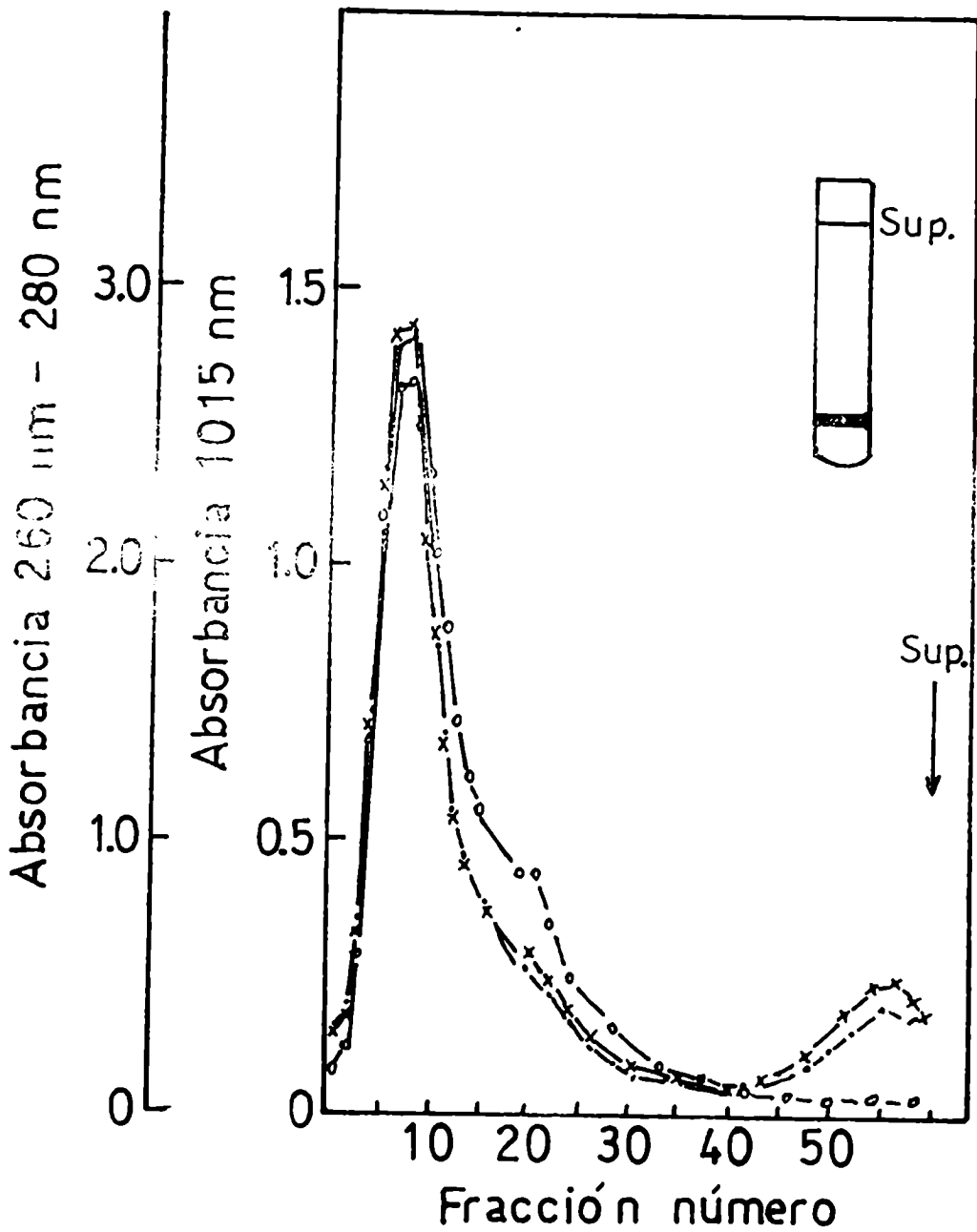


Figura 26:

Centrifugación de PMC, lavada tres veces con una solución de citocromo c en agua, (2.3 mg/ml), en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39.
 (o—o) Absorbancia a 1015 nm. (o---o) Absorbancia a 260 nm,
 (x—x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

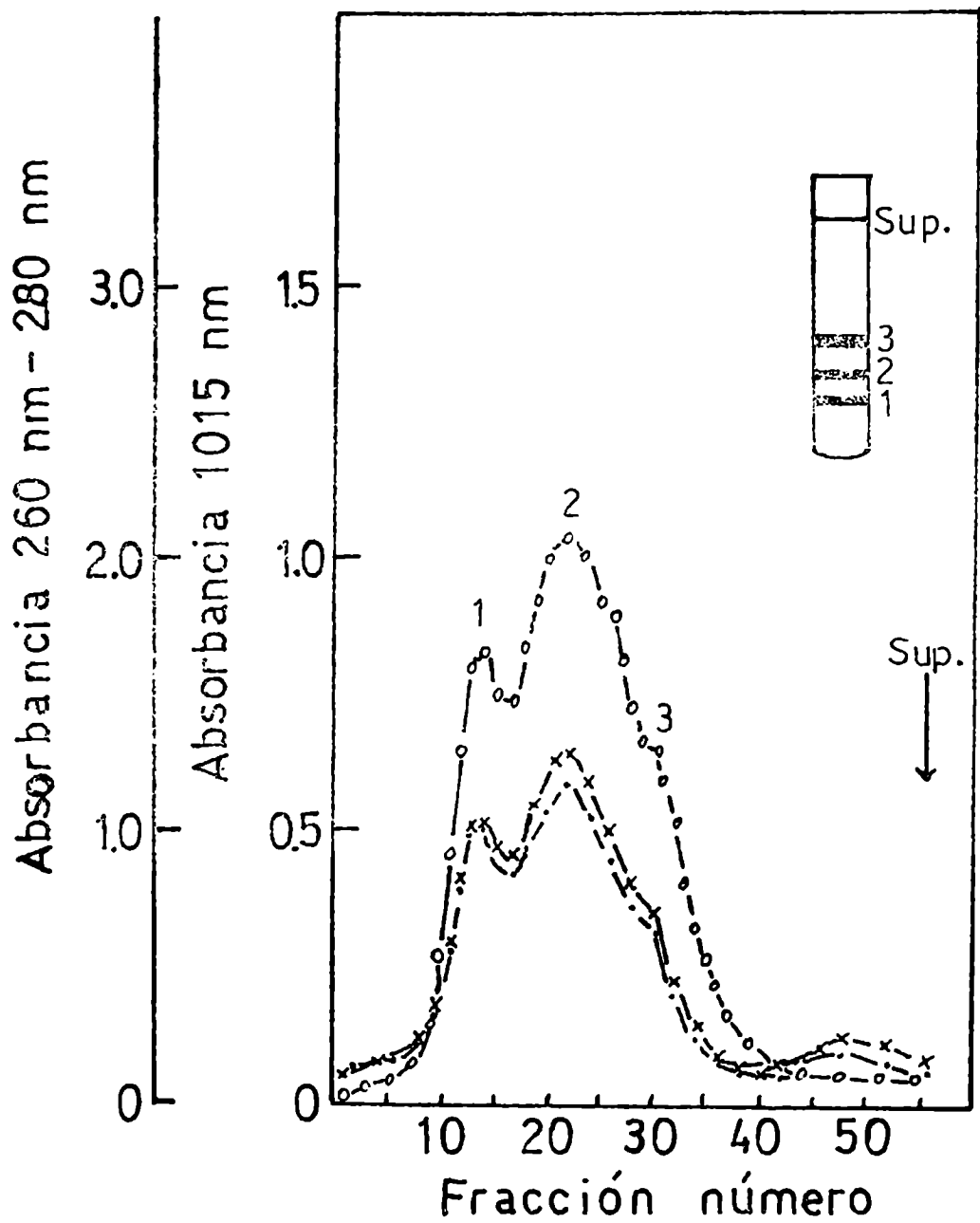


Figura 27:

Centrifugación de PMC, lavada tres veces con una solución de BSA en agua (2.3 mg/ml), en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (o — o) Absorbancia a 1015 nm, (• — •) Absorbancia a 260 nm, (x — x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

El proceso de agregación también se puede revertir resuspendiendo la PMC, lavada con PBS 10 mM pH 7.2 en su correspondiente fracción sobrenadante, obteniéndose así un perfil de absorbancia en función del número de fracciones, luego del gradiente de sacarosa, como el mostrado en la figura 28, donde se ve claramente, la desagregación producida por las proteínas del sobrenadante.

B.- Estudios hechos sobre membranas aisladas de Rps. viridis crecidas en presencia y en ausencia de extracto de levadura.

1.- Crecimiento de las células sin extracto de levadura.

Como parte del estudio de caracterización de efectos ambientales sobre las propiedades de membranas de Rps. viridis, investigamos algunas variaciones en las condiciones ambientales del crecimiento, entre las cuales se cuenta, temperatura, intensidad y calidad de iluminación y composición del medio de cultivo.

De todas éstas, la única que produjo cambios apreciables fue la eliminación total del extracto de levadura, lo que nos indujo a ahondar en el porqué de este fenómeno.

Por esta razón se hace un estudio comparativo entre membranas aisladas de la bacteria crecida en medio de Hutner y en medio de Hutner sin extracto de levadura.

Estos resultados surgieron cuando se intentó marcar las células con leucina tritiada y para controlar perfectamente la composición del medio de cultivo, se eliminó el extracto de le-

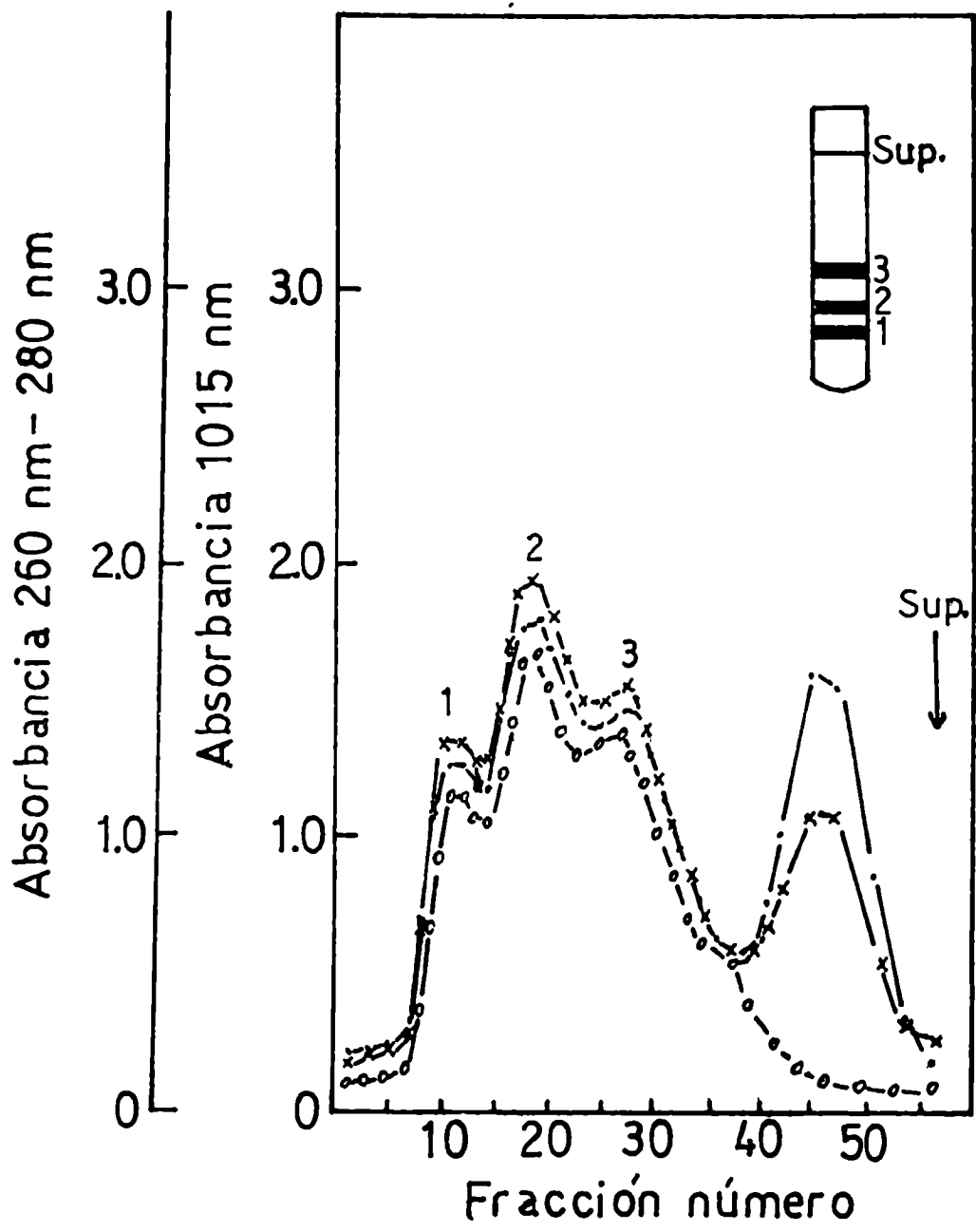


Figura 28:

Centrifugación de PMC, lavada con fracción sobrenadante (2.3 mg proteína/ml) en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (○—○) Absorbancia a 1015 nm, (·—·) Absorbancia a 260 nm, (×—×) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

vadura del mismo, suplementándolo con doble cantidad del factor de crecimiento (vitaminas).

Antes de crecer las células en medio con leucina tritiada, se acostumbró al cultivo a crecer en medio con leucina fría, sin extracto de levadura, por sucesivos pasajes a medio fresco. Fue en esta etapa que se notó, a partir del segundo pasaje a medio sin extracto de levadura, un decrecimiento en el contenido específico de Bchl de las células y que luego del 3er. ó 4to. pasaje había disminuído por un factor de 10 respecto al del cultivo en medio de Hutner con extracto de levadura, sucesivos posteriores pasajes mantenían constante ese valor.

Tabla 1. Variaciones relativas en el contenido específico de Bchl y lípidos.

Medio de cultivo	Bchl/prot	PL/prot	LO/prot	PL/Bchl	LO/Bchl	PL/LO
Medio completo	123	550	63	4.5	0.5	8.7
Medio sin extracto de levadura	12	540	16	45	13	33.7

Estos resultados representan los valores promedios obtenidos de 4 diferentes experimentos. Están dados en μ moles/mg prot (Bchl/prot; PL/Prot y LO/Prot) ó en mol/mol (PL/Bchl; LO/Bchl y PL/LO) respectivamente PL: Fósforo lípido; LO: lípido a ornitina.

En la tabla 1 se pueden ver los datos sobre las variaciones relativas en el contenido específico de Bchl y lípidos de células crecidas con y sin extracto de levadura. También la velocidad de crecimiento fue algo menor en medio sin extracto de levadura.

En lo referente al contenido específico de Bchl se ve que de un valor de 123 μ moles Bchl/mg proteína para células crecidas en medio de Hutner se llega, luego del 4to. pasaje a medio sin extracto de levadura, a un nivel de 12 μ moles Bchl/mg proteína.

2.- Repigmentación de las células con ácidos p-amino benzoico (pABA); ácido fólico y fracciones del extracto de levadura.

La mayoría de los estudios sobre organización estructural, morfogénesis y diferenciación de membrana en bacterias fotosintéticas habían sido hechos sobre microorganismos anaerobios facultativos, presentando membranas vesiculares como Rhodospirillum rubrum y Rhodopseudomonas spheroides (90; 113-116).

Mucho menos se había profundizado sobre microorganismos fotosintéticos, cuyo aparato fotosintético está contenido en un sistema lamelar de membrana intracitoplasmática como es el caso de Rps. palustris y Rps. viridis (117; 118).

Debido a que es particularmente difícil idear un sistema experimental cambiando la tensión parcial de oxígeno, que resulte útil para el estudio de la formación de los tilacoides en bacterias fotosintéticas, anaerobias obligadas como Rps. viridis, ya que estos organismos sólo pueden crecer bajo condiciones estrictamente anaeróbicas, resultó importante, hacer un estudio comparativo entre ambos tipos de membranas, crecidas en presencia y ausencia de extracto de levadura, explorando también, la interrelación precisa, existente entre el contenido celular de pigmento, el contenido y la composición de la membrana, la composición del medio de cultivo, entre otras variables, en el proceso de repigmentación de las células y aportando de esta manera datos útiles para el estudio de la formación de la membrana tilacoide en estas bacterias.

Se investigó que componentes del extracto de levadura eran necesarios para producir una velocidad de crecimiento y un contenido de pigmento como el observado habitualmente en los medios de cultivo con extracto de levadura. Para ello se fraccionó el extracto de levadura en sus componentes lipídicos y solubles en fase acuosa; mediante una extracción con cloroformo-metanol siguiendo el método de Blight y Dyer para extracción de lípidos (106).

Ambos extractos; lipídico y acuoso, se incorporaron por separado al medio de Hutner sin extracto de levadura, basándose en la concentración normal que lleva el medio de Hutner; por ejemplo, se extraía 1 gr de extracto de levadura (concentración normal / litro de medio de Hutner) y los extractos lipídicos y acuosos obtenidos eran agregados cada uno, a un litro de medio de Hutner sin

extracto de levadura; los ensayos de repigmentación se hacían habitualmente en frascos de 50 ml.

El extracto lipídico no tuvo ningún efecto sobre la velocidad de crecimiento ni el contenido de Bchl, mientras que cuando se agregaba el extracto acuoso, luego de sólo un pasaje, las células recuperaron el contenido de Bchl normal, comparándolo con controles crecidos simultáneamente en medio de Hutner completo.

Se analizó el extracto acuoso, por cromatografía en papel, luego de sucesivas cromatografías se obtuvo la separación en pequeños grupos de componentes que se probaron en su efecto de repigmentación de las células; así se descartaron gran parte de esos grupos de componentes, simultáneamente se probó el efecto de ciertas sustancias que intervienen en el metabolismo de los fragmentos de 1 átomo de carbono que llevan a la formación de purinas, timina, ácido pantoténico y metionina, como ácido fólico, ácido p-amino benzoico, serina, metionina, algunas pteridinas como biopterina ó xantopterina; fosfato de piridoxal, ácido pantoténico y algunas combinaciones de ellas.

De todos estos ensayos resultó, que el ácido p-amino benzoico (p-ABA) y el ácido fólico eran igualmente efectivos en producir un contenido de pigmento normal en las células.

Se investigó luego qué concentración mínima de estas sustancias eran necesarias y se determinó que 4.6 ug/ml concentración final de p-ABA y 14.6 ug/ml concentración final de ácido fólico en el medio de cultivo producían la misma velocidad de crecimiento y el mismo contenido específico de Bchl que las células crecidas en

medio de Hutner completo.

Comparando estas sustancias con las fracciones del extracto acuoso del extracto de levadura que producían repigmentación se vió que dichas fracciones contenían un componente que corría, en cromatografía en papel, con el mismo Rf que el p-ABA en el mismo sistema, revelándolo a la luz UV, se vió que al igual que el p-ABA la absorbía mientras que los demás componentes producían fluorescencia.

El efecto causado por la eliminación del extracto de levadura sobre estos cultivos no representa un efecto deletéreo de tipo general, sino que las células que se producen, tienen una estructura y composición definidas.

Así una vez establecidas la relación Bchl/proteína típica del cultivo, sucesivos pasajes a un medio libre de extracto de levadura no produce modificaciones adicionales.

3.- Centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa de ambos tipos de membrana.

A partir de cultivos crecidos con y sin extracto de levadura y suplementados con p-ABA ó ácido fólico se prepararon PMC de cada tipo de cultivo y se centrifugaron en los gradientes discontinuos de sacarosa usados habitualmente a 190.000 g durante 60 minutos. En la figura 29 se muestran, para comparar, los perfiles de absorbancia en función del número de fracciones obtenidos en el caso de PMC de células crecidas con extracto de levadura (29a).

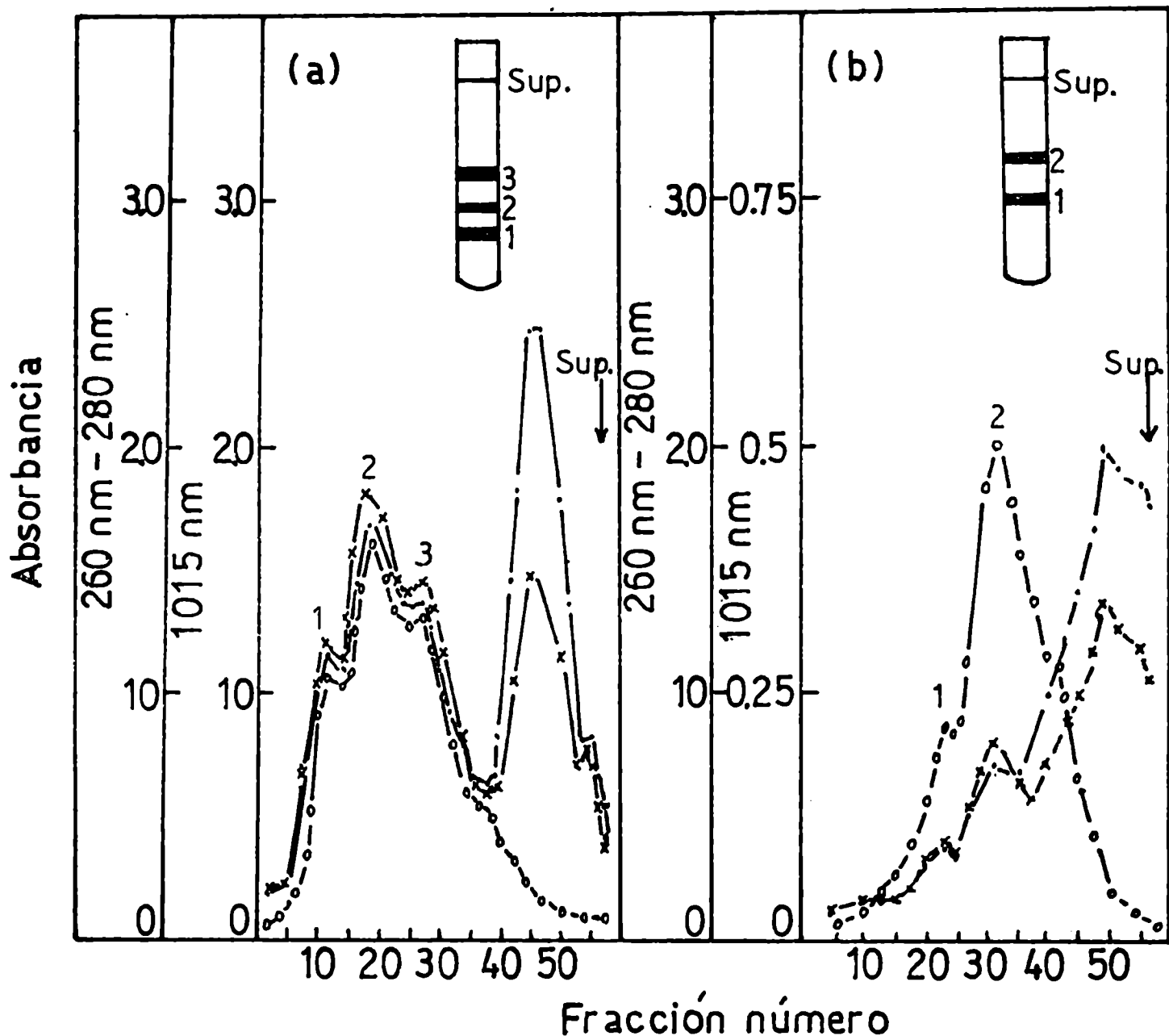


Figura 29:

(a) centrifugación de PMC obtenida de células crecidas en presencia de extracto de levadura, en un gradiente discontinuo de sacarosa. (b) Centrifugación de PMC, obtenida de células crecidas en ausencia de extracto de levadura, en un gradiente discontinuo de sacarosa. En ambos casos fue centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (•—•) Absorbancia a 1015 nm, (•—•) Absorbancia a 260 nm, (x—x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

(esta figura es coincidente con la figura 21) y de células crecidas en ausencia de extracto de levadura (figura 29b). En cada figura se incluye el diagrama del tubo de centrífuga mostrando la posición de las bandas pigmentadas luego de la centrifugación.

Comparando ambos perfiles se deduce que hay una diferencia de sensibilidad hacia la sonicación entre las distintas membranas, puesta en evidencia por valores de S más pequeños para las membranas aisladas de células crecidas en ausencia de extracto de levadura.

En la figura 30 se puede ver el perfil obtenido para el caso de células crecidas en medio de Hutner sin extracto de levadura suplementado con p-ABA ó ácido fólico.

Comparando las figuras 30 y 21 se vé que las fracciones de membrana obtenidas de células crecidas en medio suplementado con p-ABA ó ác. fólico son idénticas a las resultantes en el caso de crecer las células en medio completo.

4.- Composición proteica de ambos tipos de membrana.

Para determinar la composición proteica de las membranas se preparó PML, se resuspendió en PBS de forma de tener una concentración de 100 ug de proteína en 50 ul, se adicionó suficiente SDS y ME como para lograr una concentración final para ambos de 0.4% y se incubó 1 h a 30°C; se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida.

El trazado de absorbancia a 560 en función de la distancia

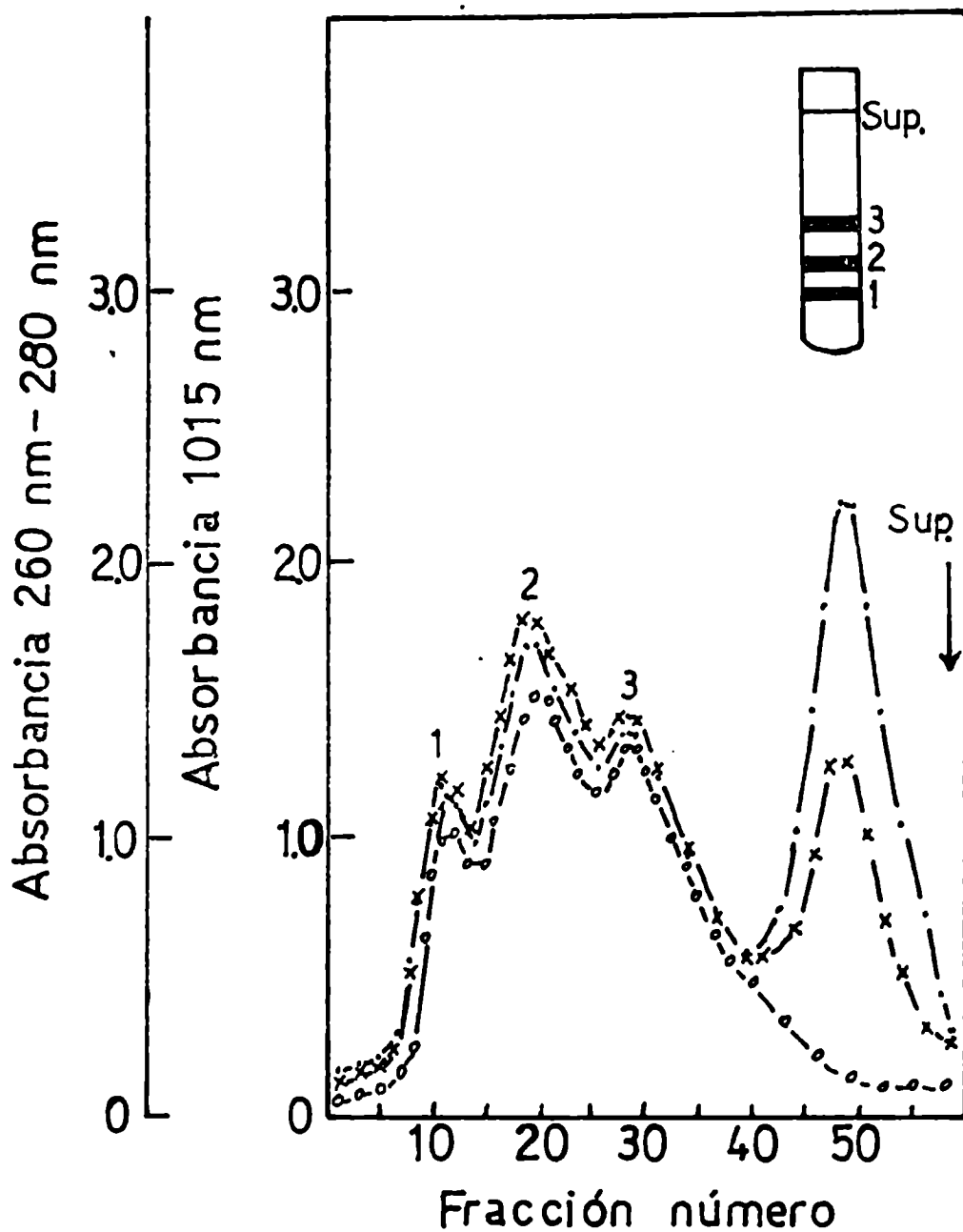


Figura 30:

Centrifugación de PMC, obtenida de células crecidas en ausencia de extracto de levadura y en presencia de p-ABA (4.6 ug/ml) ó ácido fólico (14.6 ug/ml), en un gradiente discontinuo de sacarosa. Centrifugada 60 minutos a 190.000 g en el rotor SW39. (o—o) Absorbancia a 1015 nm, (•—•) Absorbancia a 260 nm, (x—x) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

de migración y el correspondiente esquema de los geles teñidos para ambos tipos de membrana se puede ver en la figura 31.

En la PML obtenida de células que crecen normalmente (Fig 31a) se detectan 4 bandas principales (a, b, c y d), arriba de la banda d, se observan otras 10 bandas, aunque son significativamente menores. Al frente de la banda a corre otra banda (banda X) que contiene todo el pigmento originariamente presente en la membrana.

En la PML aislada de células que crecen en ausencia de extracto de levadura (Fig. 31b), también se observa la presencia de 4 bandas proteicas denominadas e, f, g y h.

La movilidad electroforética de estas 4 bandas es idéntica a la de las bandas a, b, c y d.

Arriba de la banda h se observan otras 8 bandas que también están presentes en la membrana aislada de células que crecen normalmente.

Al frente de la banda e, es posible ver, una proteína que contiene pigmento con igual movilidad que la banda X.

De la observación de la figura 31b surge que las bandas que tienen menor movilidad que la banda h tiene mayor intensidad que las correspondientes bandas del otro tipo de membranas y guardan con las 4 bandas principales una relación diferente a la observada en la figura 31a.

5.- Composición de lípidos y ácidos grasos de ambas membranas

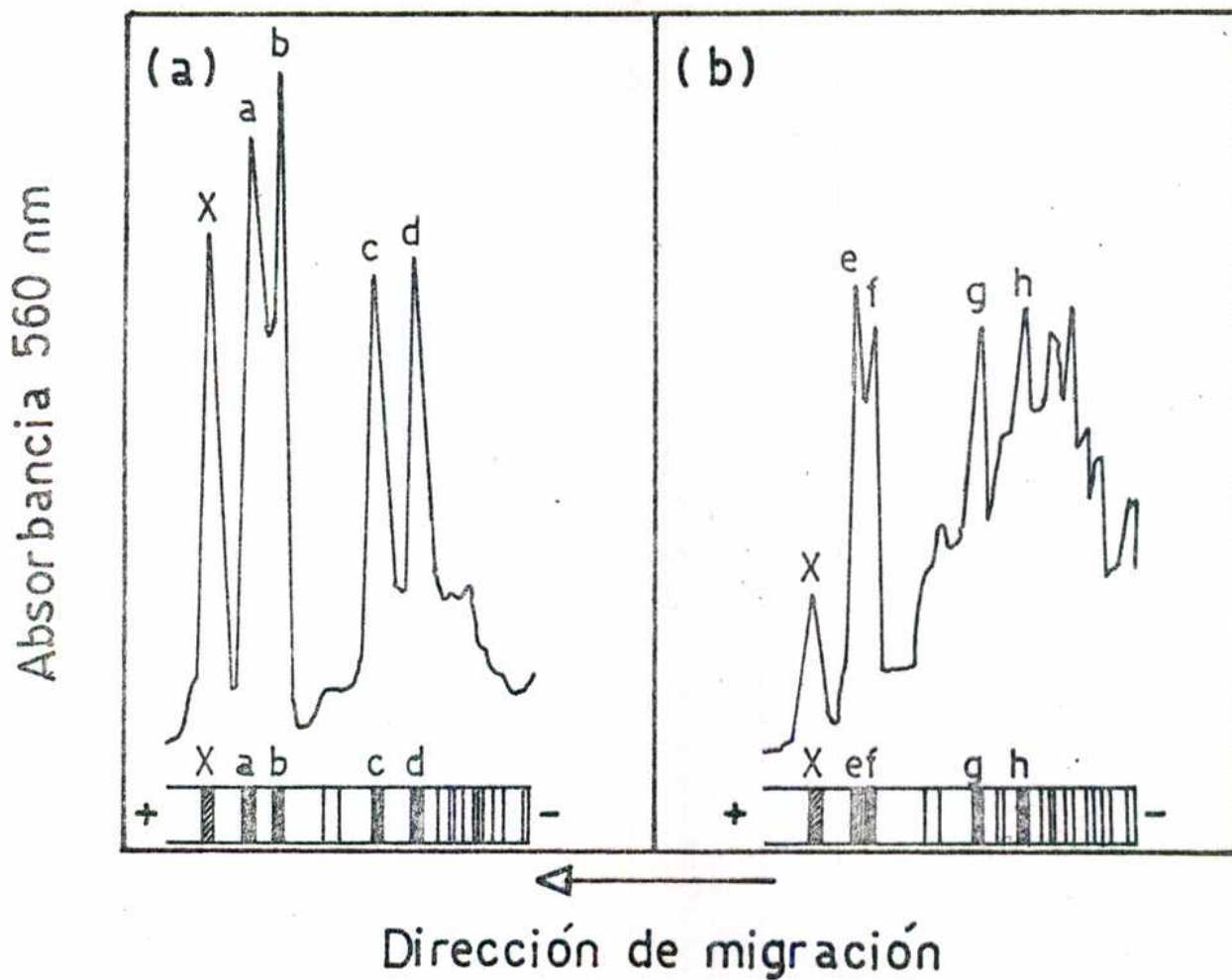


Figura 31:

Electroforesis en gel de poliacrilamida. (a), membranas intactas aisladas de células crecidas en presencia de extracto de levadura. (b) membranas intactas aisladas de células crecidas en ausencia de extracto de levadura. En ambos casos los gels contienen 0.4% SDS y las muestras fueron tratadas con 0.4% SDS y 0.4% ME.

a.- Composición de lípidos.

De membranas obtenidas de células crecidas en ambas condiciones se extrajeron los lípidos por el procedimiento de Blight y Dyer (106).

El extracto lipídico se sometió a comatografía bidimensional en capa delgada, y se reveló con los reactivos adecuados.

En la figura 32 a y b se muestra un esquema de las placas reveladas observándose la siguiente composición cualitativa: difosfatidilglicerol, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, lípido a ornitina, y algunos otros lípidos cuantitativamente menores y cuya estructura no hemos determinado.

Por estimación visual de acuerdo a la intensidad de color luego de revelar las placas, se observó que el crecimiento de las células sin extracto de levadura, produce un incremento en la relación fosfatidilcolina a fosfatidiletanolamina, esencialmente debido a una disminución en la concentración de fosfatidiletanolamina.

La disminución en el último fosfolípido está acompañado por una disminución en la concentración del lípido a ornitina.

Por otro lado, las relaciones de fosfatidilcolina a fosfatidilglicerol y fosfatidilcolina a difosfatidilglicerol no se afectaron significativamente por el cambio introducido en el medio de cultivo.

En la tabla 1 se muestran variaciones relativas en el contenido específico de Bchl y lípidos. Se observa que la disminución

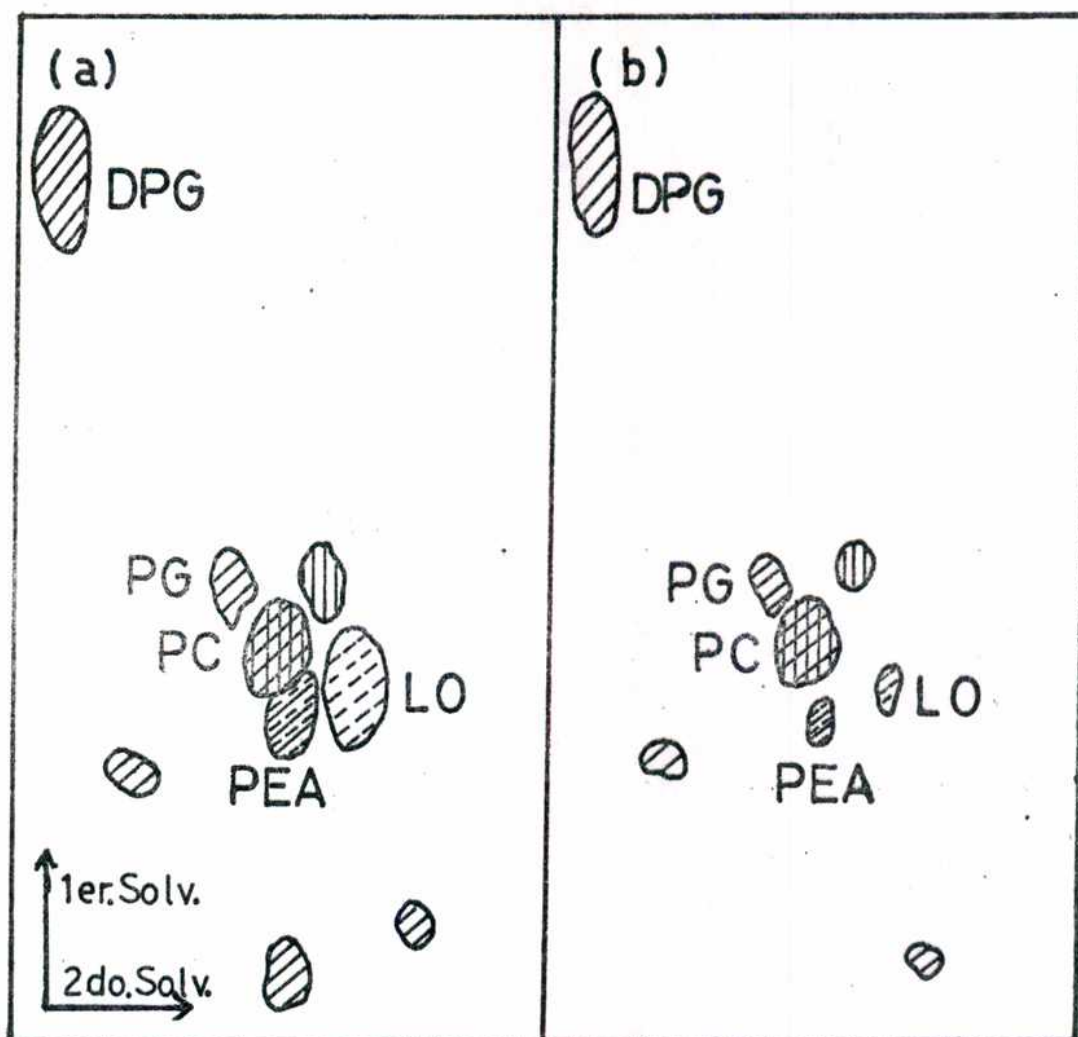


Figura 32:

Cromatografía en capa delgada. (a) Extracto lipídico obtenido de células crecidas en presencia de extracto de levadura. (b) Extracto lipídico obtenido de células crecidas en ausencia de extracto de levadura. Lípidos conteniendo fósforo (//), lípidos conteniendo grupos NH_2 (/), lípidos conteniendo colina (|||). DPG: difosfatidilglicerol, PG: fosfatidilglicerol, PC: fosfatidilcolina, PEA: fosfatidiletanolamina, LO: lípido a ornitina.

en el contenido específico de Bchl es paralelo al aumento en la relación de fósforo lipídico a Bchl (PL/Bchl), cuando se cambia la composición del medio de cultivo.

En cambio las relaciones, fósforo lipídico/proteína y lípido a ornitina/Bchl permanece aproximadamente constante.

De estos resultados se deduce que aunque la composición de lípidos es cualitativamente semejante, la concentración de lípido a ornitina es mucho menor y esta disminución es paralela a la disminución en el contenido de Bchl de las células crecidas en ausencia de extracto de levadura.

b.- Composición de ácidos grasos.

Los ácidos grasos se obtuvieron a partir del extracto lipídico (método de Blight y Dyer (106) de membranas crudas aisladas de ambos tipos de células.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos. Se puede ver que la mayoría de los ácidos grasos corresponden a 16 y 18 átomos de carbono saturados o con una doble ligadura (C18:1, C16:0 y C16:1).

También se detectan otros ácido grasos de cadena recta, pero no se observaron ácidos grasos ramificados.

Estos resultados son similares a los presentados por Schroder y Drews (119) y Schroder y colaboradores (120) para otras bacterias.

En el caso de células crecidas en ausencia de extracto de levadura, la composición de ácidos grasos es cualitativa y cuantitativamente similar (Tabla 2). Sólo se puede mencionar una disminución significativa en la concentración de C16:1 y un incremento en la concentración de los ácidos grasos que contienen 19; 20 y 22 átomos de carbono

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de membranas crecidas bajo diferentes condiciones.

Acidos grasos	Crecimiento en presencia de extracto de <u>le</u> vadura.	Crecimiento en ausencia de extracto de <u>le</u> vadura
Por ciento del total de ácidos grasos		
C12:0	1.9	0.5
C13:0	trazas	trazas
C13:1	trazas	trazas
C14:0	3.0	1.3
C14:1	0.5	trazas
C15:0	1.0	0.4
C15:1	0.6	0.3
C16:0	15.0	16.0
C16:1	18.0	8.0
C17:0	trazas	trazas
C17:1	trazas	trazas
C18:0	3.0	3.0
C18:1	55.0	60.0
C18:2 ó		
C19:0	trazas	2.7
C20:0	no detectado	3.0
C20:1	1.7	3.0
C22:0	no detectado	1.0

6.- Espectros de absorción de ambas membranas.

En la figura 33 se muestran los espectros de absorción correspondientes a ambas membranas, aparte de diferencias menores es interesante destacar que el espectro de absorción de membranas aisladas de células crecidas sin extracto de levadura presenta una banda extra a 354 nm, si se compara con el espectro de absorción de membranas aisladas de células crecidas en medio completo.

En la zona del IR cercano el espectro de absorción de ambas membranas es idéntico.

7.- Purificación de complejos Bchl-proteína de ambos tipos de membrana.

Con el fin de relacionar la estructura proteica de la membrana con la función de dichas proteínas, se intentó la purificación de complejos Bchl-proteína.

Basándonos en uno de los procedimientos para aislar CR que se explicará más adelante, mediante el uso de detergentes iónicos (SDS), PMC de células crecidas normalmente se trataron con SDS en la relación adecuada para aislar CR es decir: 12 mg detergente/umol Bchl.

Para eliminar el exceso de SDS se pasó la preparación por una columna de Sephadex G25 y la muestra así obtenida se centrifugó en un gradiente continuo de sacarosa con Tritón X100, urea, a pH alcalino (AUT) (101 y 102).

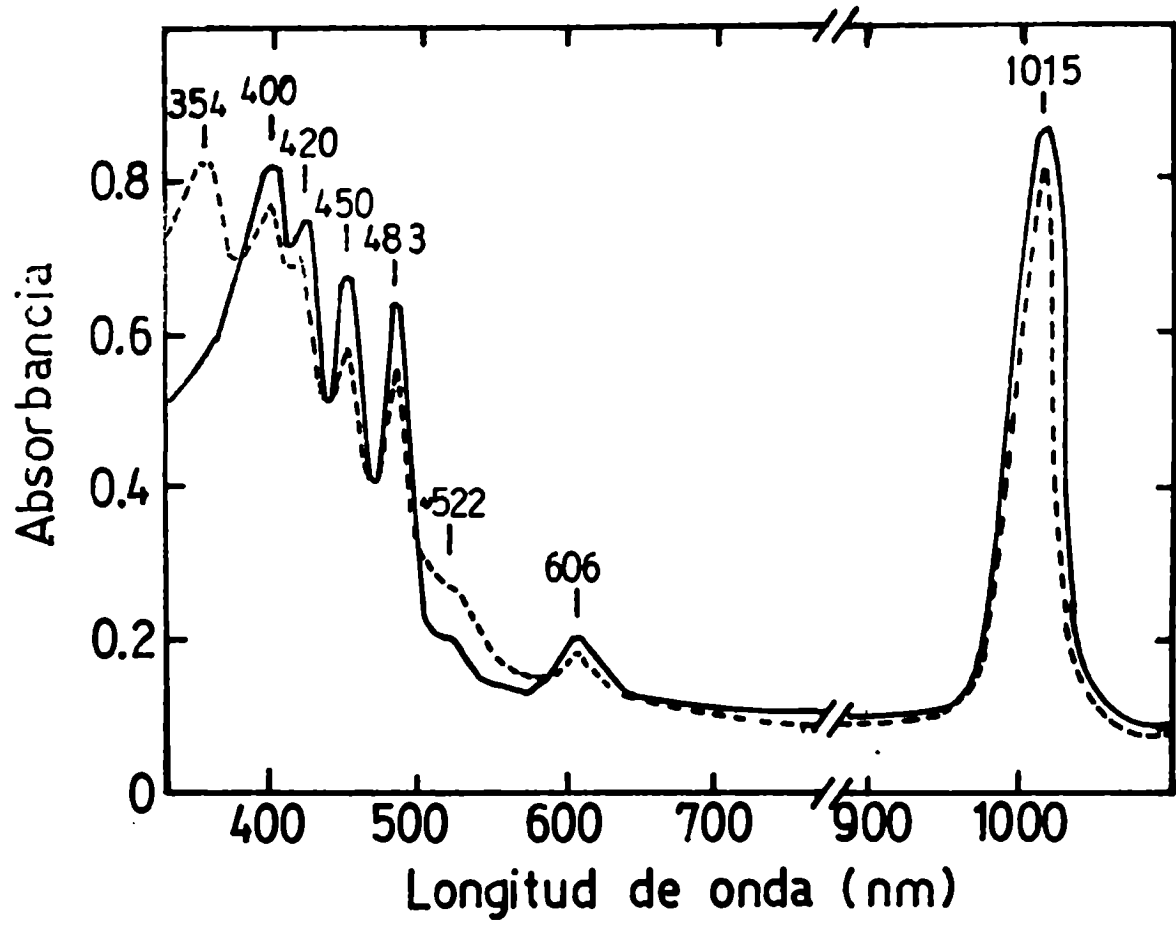


Figura 33:

Espectro de absorción en la zona visible e IR cercano. (—) membranas de células crecidas en presencia de extracto de levadura. (-----) membranas de células crecidas en ausencia de extracto de levadura.

Como resultado del gradiente se obtuvieron 2 bandas pigmentadas, una superior, verde, y una inferior, marrón, muy bien separadas, ubicadas aproximadamente en la mitad del gradiente.

Un nuevo gradiente de sacarosa AUT de ambas bandas no contribuía a una mayor purificación de los complejos.

Este mismo procedimiento se aplicó a membranas obtenidas de células crecidas en ausencia de extracto de levadura, sólo que en este caso fue necesario modificar la relación de SDS/Bchl para lograr separación de los complejos pigmento-proteína.

La relación usada fue: 100 mg detergente/ μ molBchl.

Las membranas así tratadas, previo pasaje por una columna de Sephadex G25 se centrifugaron en gradientes continuos de sacarosa, AUT, también en este caso se obtuvieron 2 bandas pigmentadas (una verde y una marrón) ubicadas en las mismas zonas del gradiente.

En la figura 34 se muestran los espectros de absorción correspondientes al complejo verde obtenido de ambos tipos de membrana.

Ambos espectros presentan en el IR cercano sólo una banda de absorción a 685 nm que es característica de la Bchl antenna oxidada.

Sin embargo, en la zona visible del espectro se observan diferencias, detectándose un máximo de absorción a 458 nm para la preparación de membranas obtenidas de células crecidas normalmente y un máximo a 418 nm en el caso de células crecidas en ausencia de extracto de levadura.

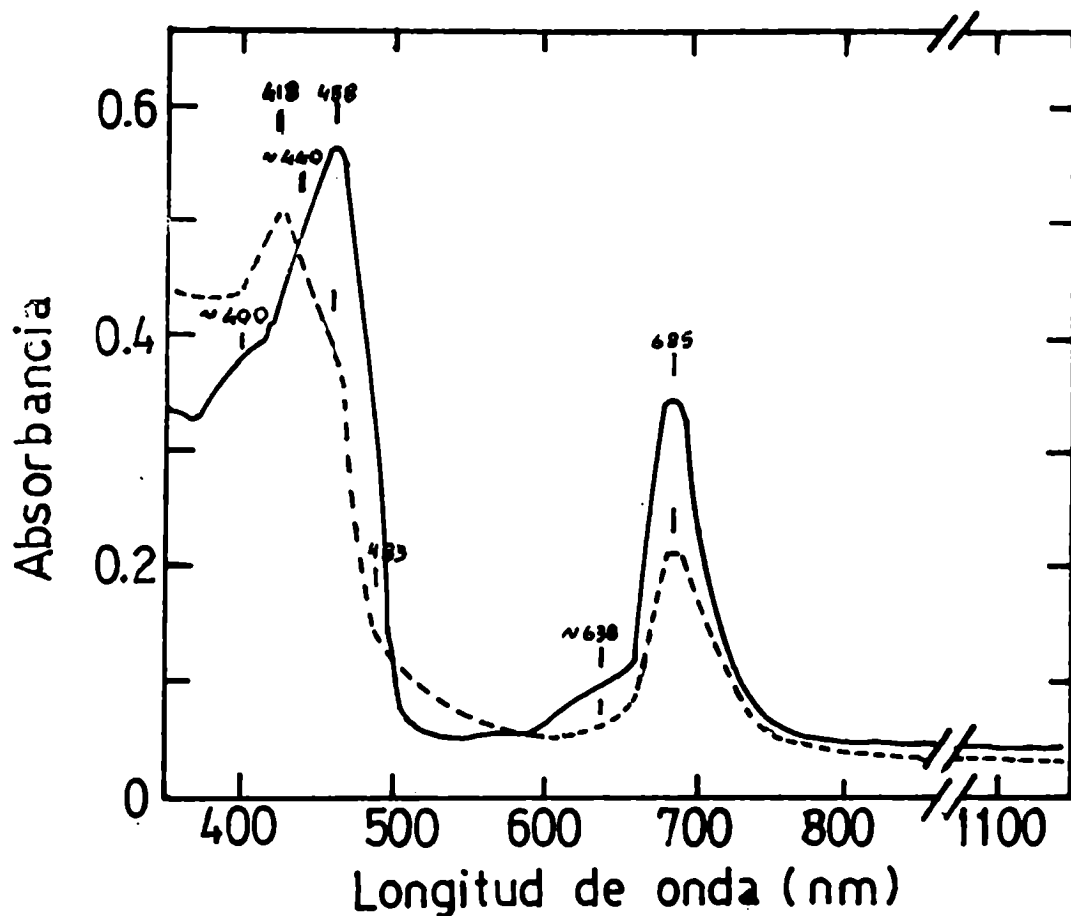


Figura 34:

Espectro de absorción del complejo verde Bchl-proteína, aislado por centrifugación en un gradiente de sacarosa AUT, de membranas obtenidas de ambos tipos de células. (—) células crecidas en presencia de extracto de levadura, (- - - -) células crecidas en ausencia de extracto de levadura.

Para investigar si estas diferencias se debían a la presencia de un medio ambiente proteico diferente, se sometieron dichos complejos a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (concentración final 0.4% SDS y 0.4% ME) y se obtuvieron los trazados de absorbancias a 560 nm en función de la distancia de migración (para geles teñidos con Coomassie blue) que se muestran en la figura 35.

Se puede ver que en el caso de células crecidas normalmente se obtienen 2 bandas proteicas principales (bandas a y b) cuya movilidad es idéntica a la observada para las bandas a y b del perfil proteico de la membrana, en el mismo sistema de geles (Figura 31a).

Esto indica que las bandas a y b de la figura 31b están asociadas con la Bchl antena en la membrana.

En el caso de células crecidas en ausencia de extracto de levadura, el perfil proteico es diferente, observándose 3 bandas proteicas de mayor intensidad, 2 de las cuales (e y f) tienen iguales movilidades que las bandas a y b, la tercera, banda h (que coincide con la posición de la banda d) corresponde sin duda a la proteína más abundante de este complejo.

De aquí se deduce que las diferencias observadas en el espectro de absorción (figura 33) son debidas con gran probabilidad a diferencias en su composición proteica, así como también a diferencias cualitativas en sus pigmentos accesorios.

El otro complejo aislado por este método, (banda marrón) corresponde al complejo CR, cuya purificación y caracterización

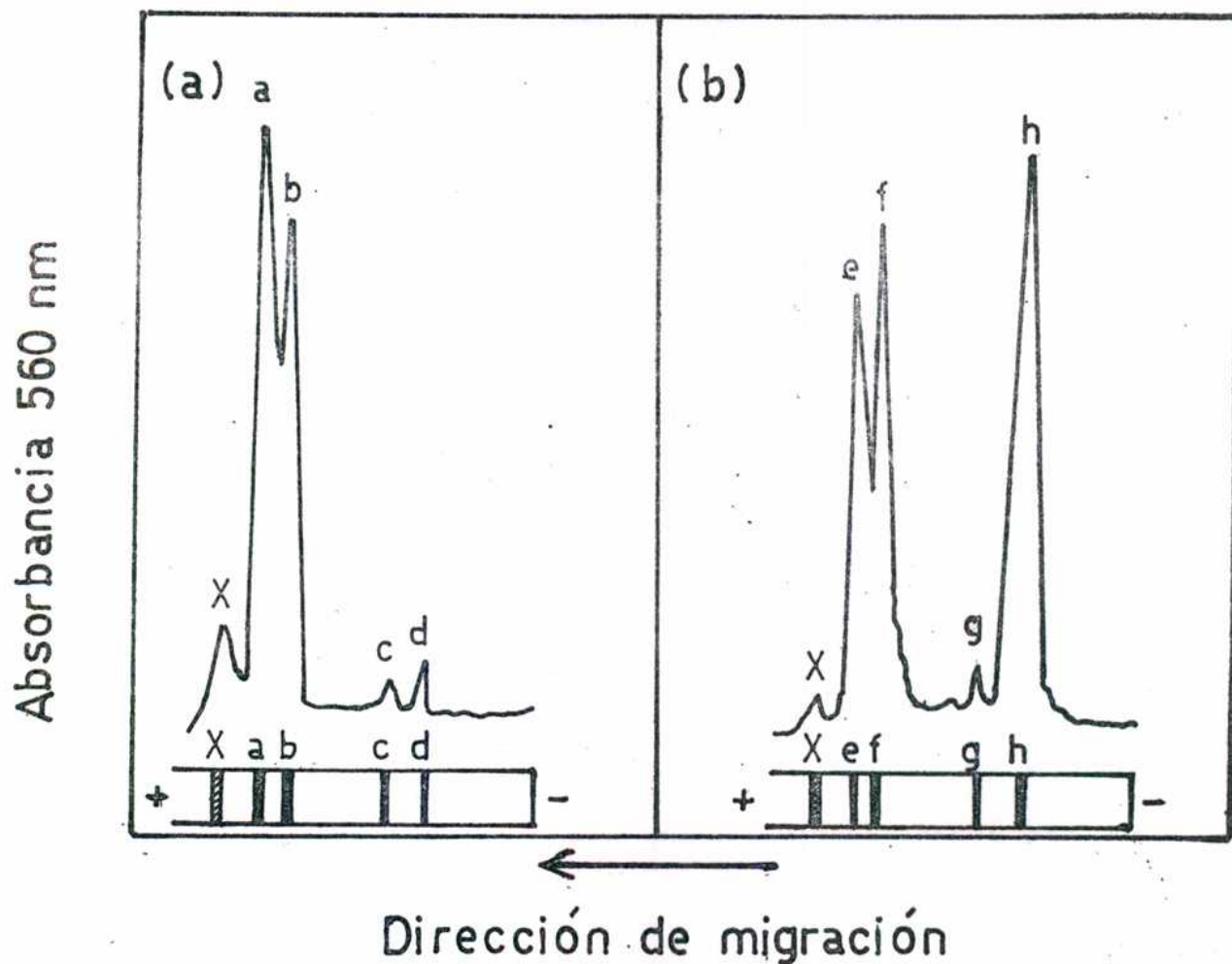


Figura 35:

Electroforesis en gel de poliacrilamida. (a), complejo verde aislado de células crecidas en presencia de extracto de levadura. (b), complejo verde aislado de células crecidas en ausencia de extracto de levadura. En ambos casos los gels contienen 0.4% SDS y las muestras fueron tratadas con 0.4% SDS y 0,4% ME.

se tratará a continuación.

C.- Purificación y caracterización del centro de reacción aislado de membranas de Rps. viridis.

1.- Purificación del centro de reacción.

a.- Empleando un detergente iónico: SDS.

El procedimiento utilizado para preparar centro de reacción usando SDS, está descrito en detalle en MATERIALES Y METODOS.

La banda marrón que se separa en el gradiente de sacarosa (AUT) contiene el CR.

Un espectro de esta preparación en la zona visible e IR cercano se puede ver en la figura 36.

Presenta un espectro característico de CR, mostrando en el IR cercano 3 bandas de absorción cuyos máximos están en 685, 835 y 975 nm.

En el visible se observan bandas a 378, 418 y 613 nm y hombros a 458 y 483. Empleando este mismo procedimiento se preparó CR de células crecidas en medio de Hutner sin extracto de levadura, excepto que en este caso se usó una relación de 100 mg detergente/umol de Bchl y la concentración final de SDS fue el 1.2%.

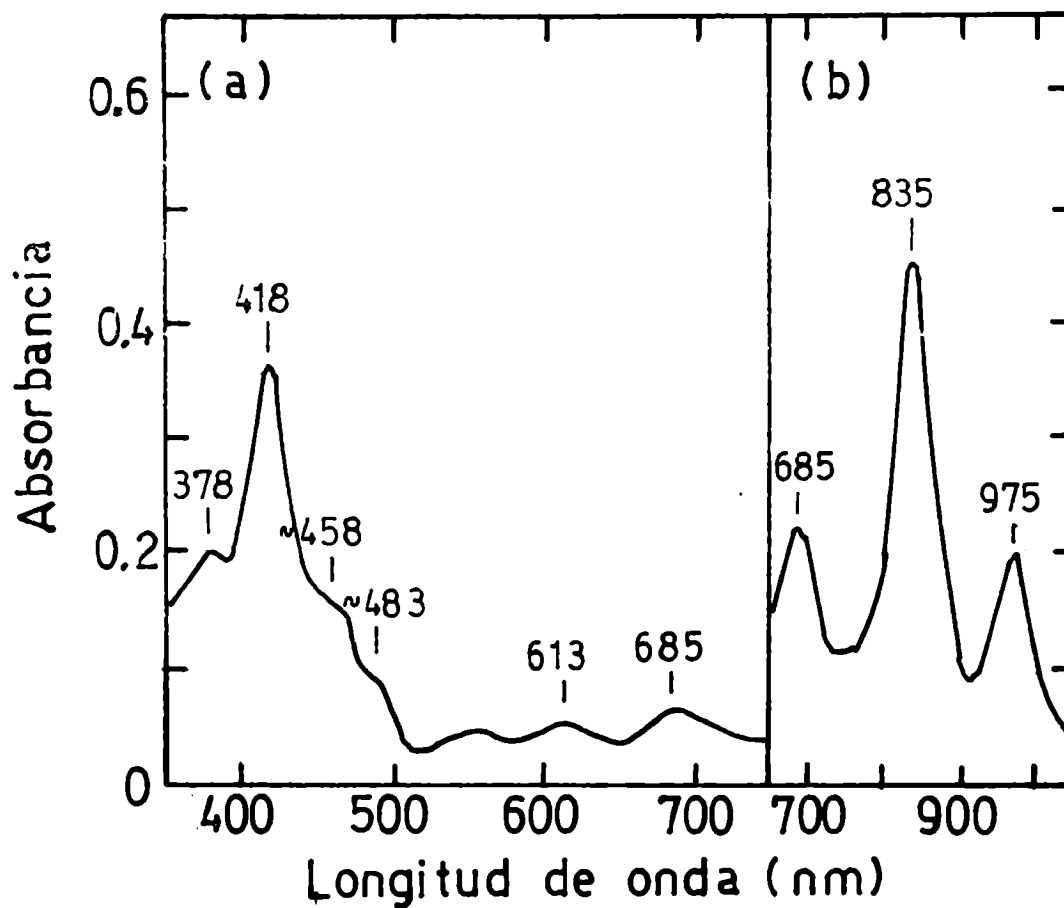


Figura 36:

Espectro de absorción en el visible (a), y en el IR cercano (b), del CR purificado por el procedimiento A, luego del gradiente de sacarosa AUT.

Esta relación fue encontrada experimentalmente ya que la usada en el caso de células crecidas en medio completo no permitió aislar las partículas CR.

En el gradiente de sacarosa AUT se separaron una banda verde (complejo Bchl antena-proteína) una banda marrón, que contenía CR y una banda extra color rosa, que contenía carotenoides y proteínas.

El espectro de absorción de la banda marrón es idéntico al obtenido a partir de células que crecen normalmente (Fig.36).

La figura 37 muestra el espectro de absorción en el IR cercano, de la preparación de CR (de células que crecen normalmente), obtenido luego de la recromatografía en hidroxilapatita (paso previo al gradiente de sacarosa AUT), comparando las figuras 36 y 37 se puede observar que la centrifugación en el gradiente de sacarosa AUT, permite obtener una preparación de CR con considerablemente menor cantidad de Bchl antena oxidada, esto surge de una disminución notable en la banda a 685 nm.

Considerando la relación de absorbancias OD_{835nm}/OD_{685nm} ; se obtiene un valor muy cercano a 1 en el espectro de la figura 37, mientras que en la figura 36 alcanza a un valor de 2.

En cambio no hay variación en la relación OD_{975nm}/OD_{835nm} que tiene un valor cercano a 0.4 para ambos espectros.

b.- Empleando un detergente no iónico: LDAO.

Se usaron 2 procedimientos ligeramente diferentes utilizan-

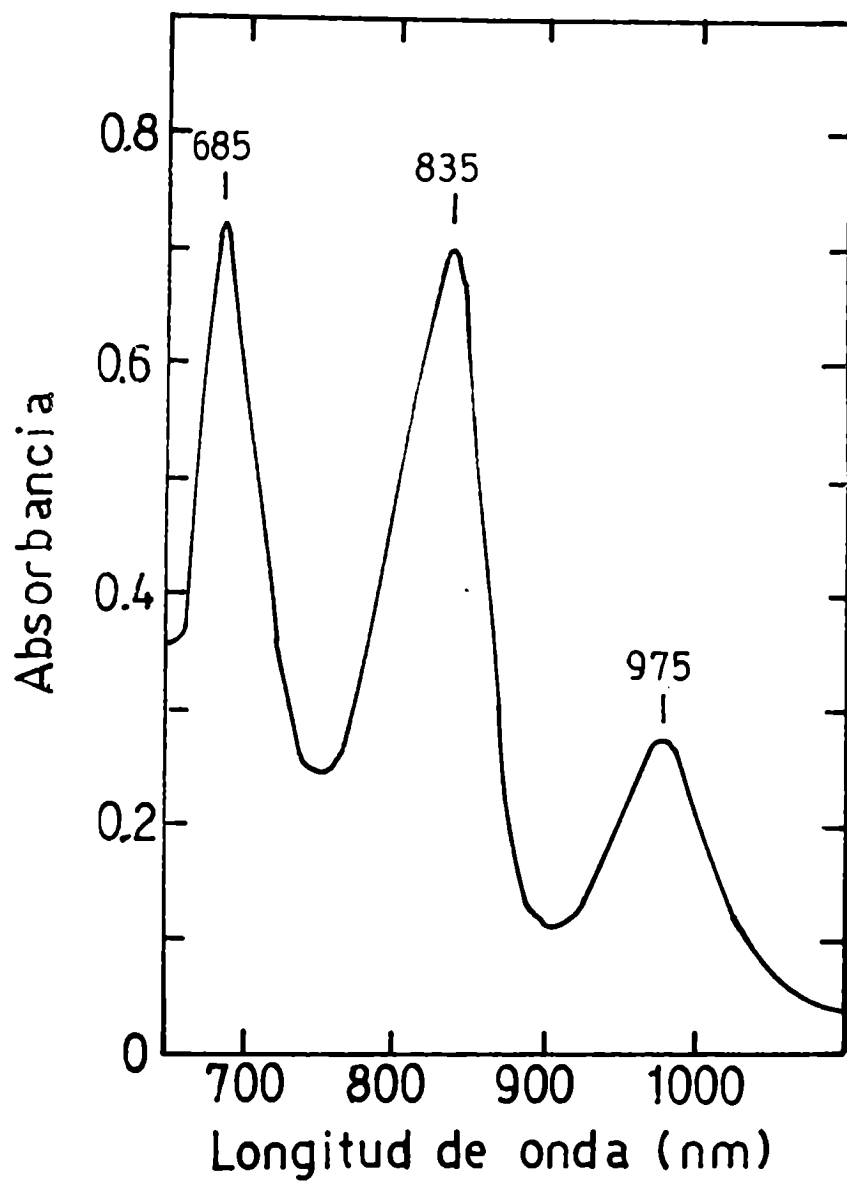


Figura 37:

Espectro de absorción en el IR cercano del CR obtenido por recromatografía en hidroxilapatita (Proc. A).

do LDAO.

Los procedimientos B y C usados se detallaron en MATERIALES Y METODOS.

En la tabla 3 se muestran las diferentes relaciones de absorbancia y el porcentaje de proteína recuperada en las diferentes etapas de purificación según el procedimiento B.

Tabla 3. Purificación del centro de reacción
por el procedimiento B.

Paso de purificación	Relación de absorbancias.			% de proteína recuperada.
	280/830	830/685	965/830	
Precipitación con sulfato de amonio	7.24	2.0	0.43	8.0
Celite	2.66	6.7	0.43	3.2
DEAE	2.47	7.5	0.43	1.9
Primer gradiente de sacarosa	2.0	9.0	0.43	1.5
Segundo gradiente de sacarosa	1.8	9.1	0.43	1.5

En esta tabla los datos corresponden a los valores obtenidos luego de juntar las fracciones que cumplen con las relaciones de absorbancias: que se mencionaron en MATERIALES Y METODOS.

En la precipitación con sulfato de amonio se elimina gran parte de la proteína y Bchl antenna contaminantes, obteniendo una

relación de absorbancias OD_{830nm}/OD_{685nm} de 2, valor que coincide aproximadamente con el obtenido en el último paso del procedimiento A.

En la figura 38 se puede ver el espectro de absorción en el IR cercano de la fracción que precipita entre 23 y 30% de sulfato de amonio w/v y que contiene el CR.

En el paso siguiente, gradiente de sulfato de amonio usando celite como soporte, se juntan las fracciones que presentan las siguientes relaciones OD_{830nm}/OD_{685nm} mayores o iguales que 6 y al mismo tiempo OD_{280nm}/OD_{830nm} menores o iguales que 3.

En este paso se obtiene una notable disminución en las proteínas y en la Bchl antenna, como se ve en los datos de la tabla 3, que muestra una disminución de 2.7 veces para la relación OD_{280nm}/OD_{830nm} (Equivalente a una disminución de esa magnitud en las proteínas) y un aumento de 3.3 veces en la relación OD_{830nm}/OD_{685nm} (equivalente a una disminución de la misma magnitud en la Bchl antenna contaminante).

En la figura 39 se muestra un espectro de absorción en el IR cercano del CR obtenido en esta etapa, donde se observa que todavía contiene Bchl antenna.

El paso siguiente es una cromatografía de intercambio iónico en DEAE celulosa.

En esta etapa se juntan las fracciones que cumplen con la relación de absorbancia OD_{280nm}/OD_{830nm} menor o igual que 2.7

Aquí también se observa una posterior purificación en proteínas y Bchl antenna, de los datos de la tabla 3, resulta una dis-

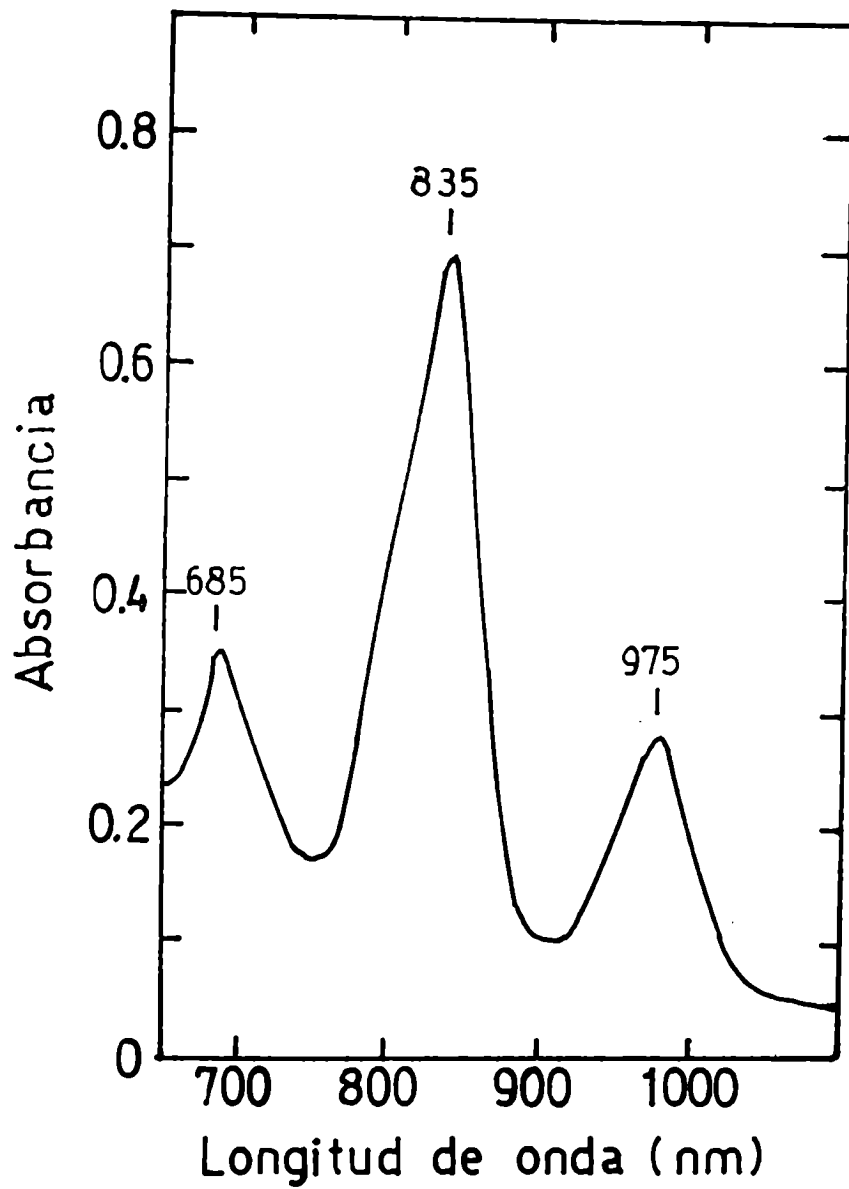


Figura 38:

Espectro de absorción en el IR cercano del CR luego de una precipitación fraccionada con sulfato de amonio (Proc. B).

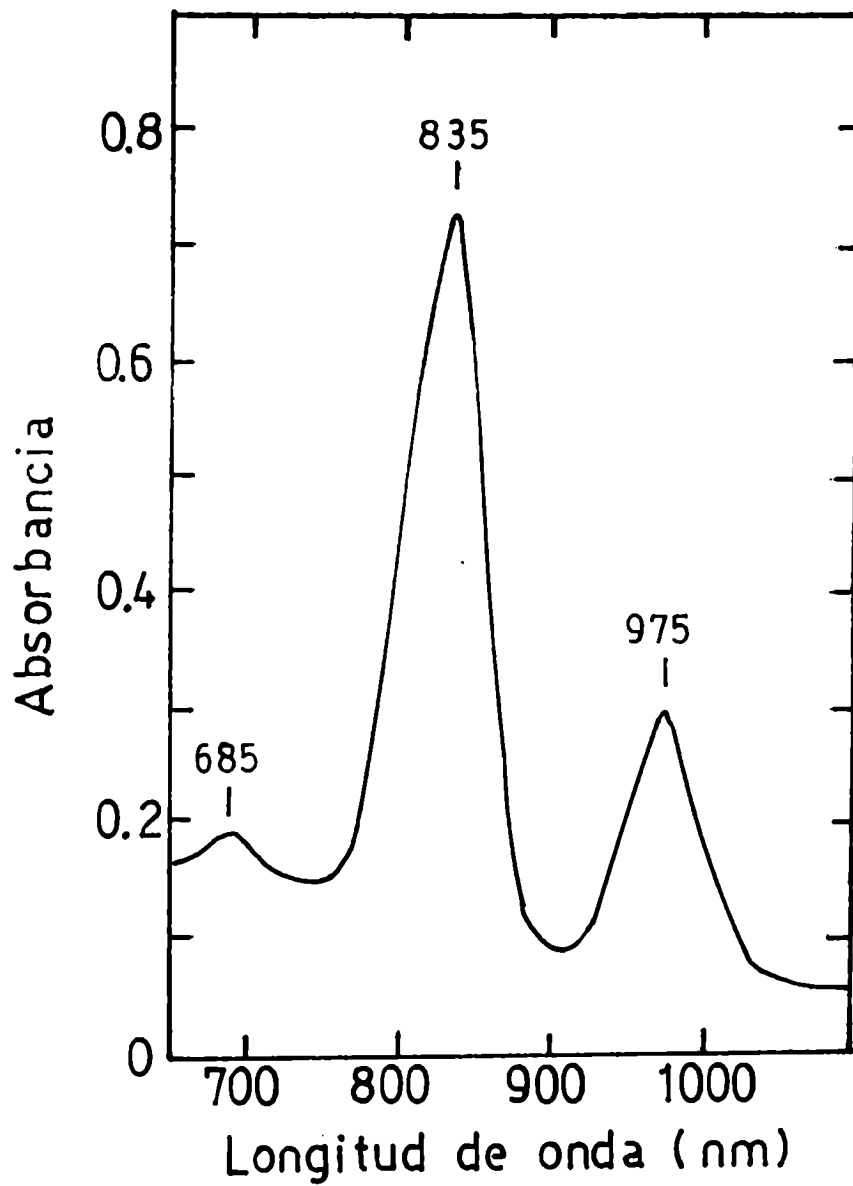


Figura 39:

Espectro de absorción en el IR cercano del CR luego de un gradiente de sulfato de amonio, usando celite como soporte (Proc. B).

minución de 1.07 veces en las proteínas y de 1.12 veces en la Bchl antena.

La figura 40 muestra el espectro de absorción en el IR cercano del CR obtenido luego de la cromatografía en DEAE celulosa.

Se puede observar que la preparación de CR aún contiene Bchl antena.

En el paso siguiente, centrifugación en gradiente continuo de sacarosa, se logra una posterior purificación de 1.23 veces en las proteínas y de 1.2 veces en Bchl antena (según los datos de la tabla 3).

En la figura 41 se muestra el perfil de absorbancias a 280 nm y 830 nm en función del número de fracciones, donde se observa que las fracciones que contienen proteínas contaminantes se ubican en la parte superior del gradiente, pudiéndoselas separar de las que contienen CR. También la Bchl antena se ubica en la zona superior del gradiente.

La última etapa, es un segundo gradiente continuo de sacarosa. En la figura 42 se puede ver el perfil de absorbancias a 280 nm y 830 nm en función del número de fracciones donde se observa una única banda a 280 nm cuyo máximo coincide con el de la curva a 830 nm.

Un espectro de la preparación del CR purificado se muestra en la figura 43.

La pureza del CR obtenida por este procedimiento fue seguida por los siguientes criterios:

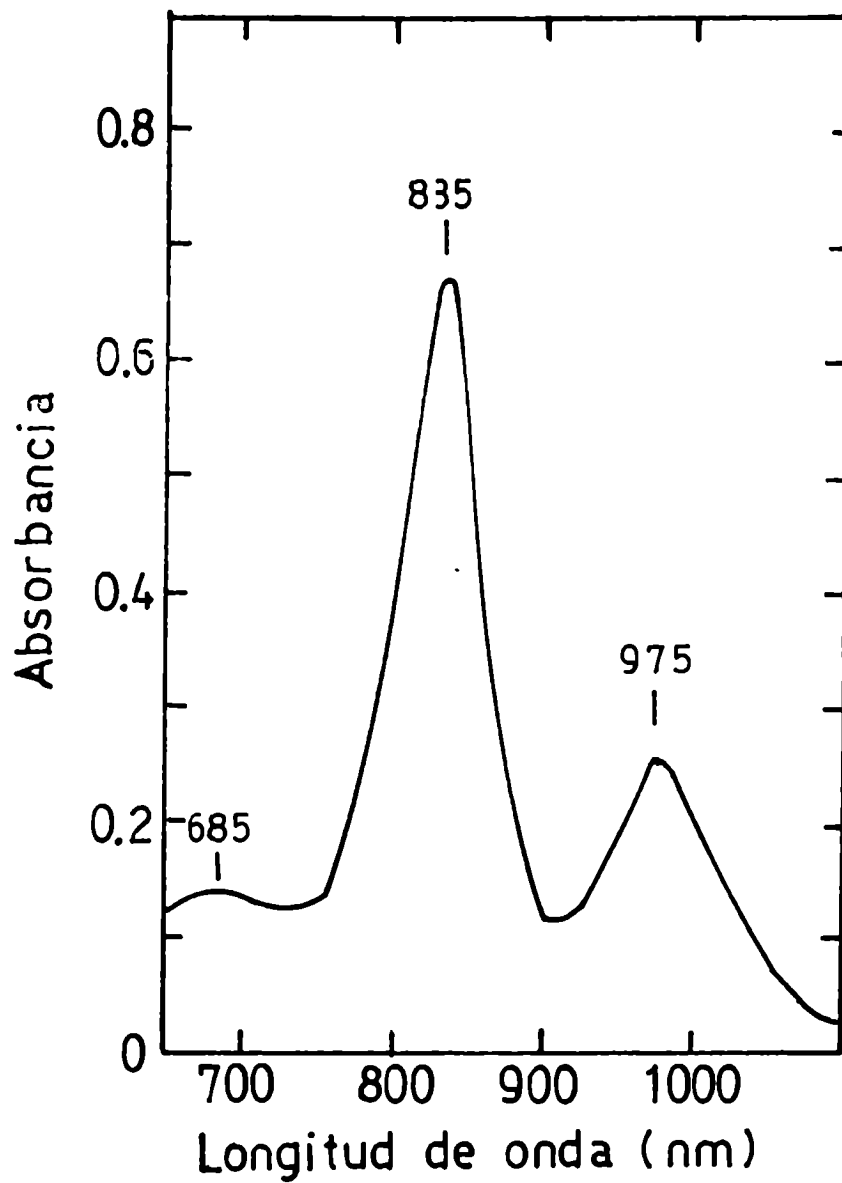


Figura 40:

Espectro de absorción en el IR cercano del CR, luego de una cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa (Proc. B).

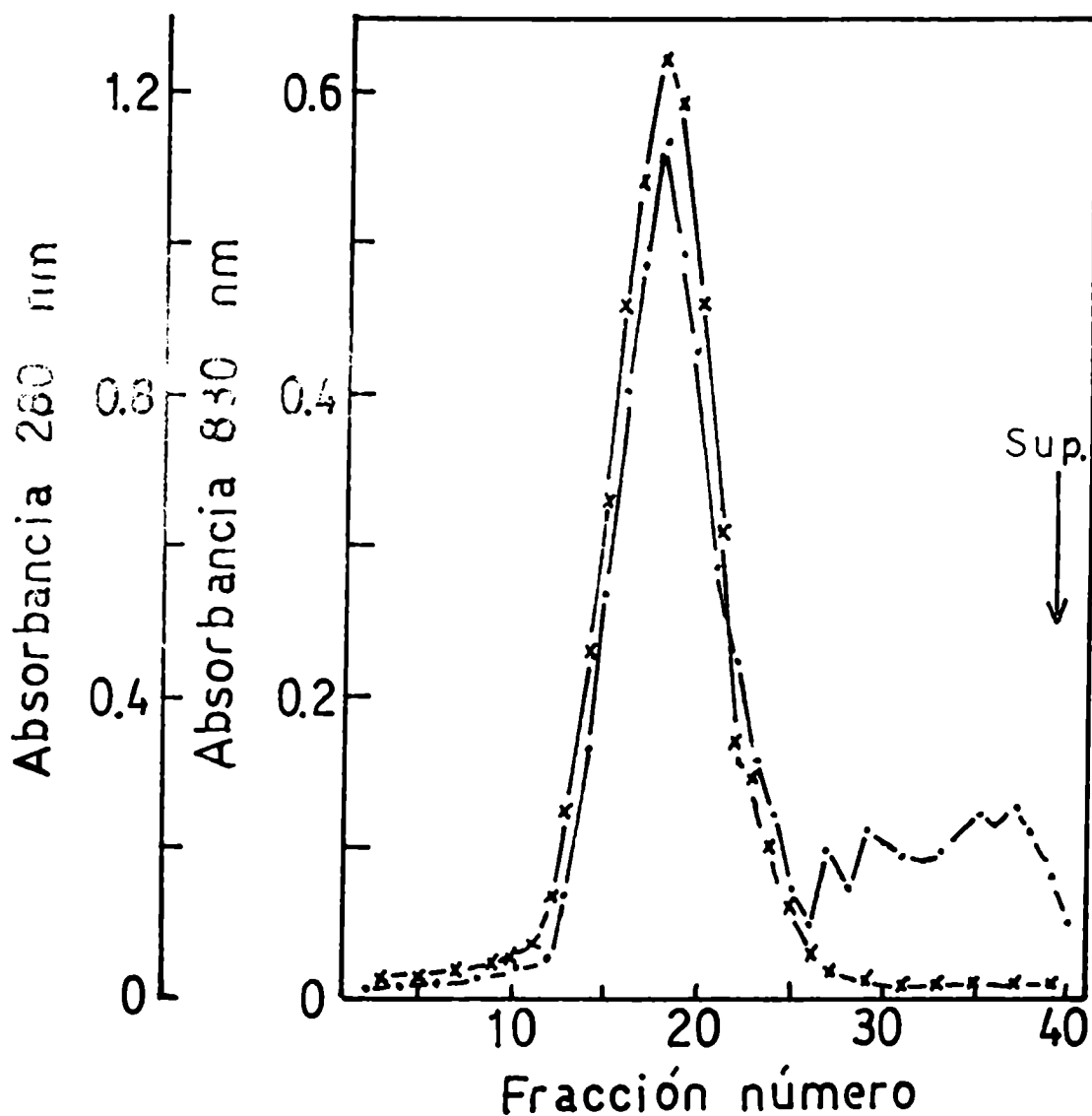


Figura 41:

Centrifugación en gradiente continuo de sacarosa entre 0.1 y 0.4 M, del CR proveniente de cromatografía en DEAE-celulosa. Se centrifugó 17 hs. a 250.000 g en el rotor SW50. (x — x) Absorbancia a 830 nm, (· — ·) Absorbancia a 280 nm. Sup. indica la parte superior del gradiente.

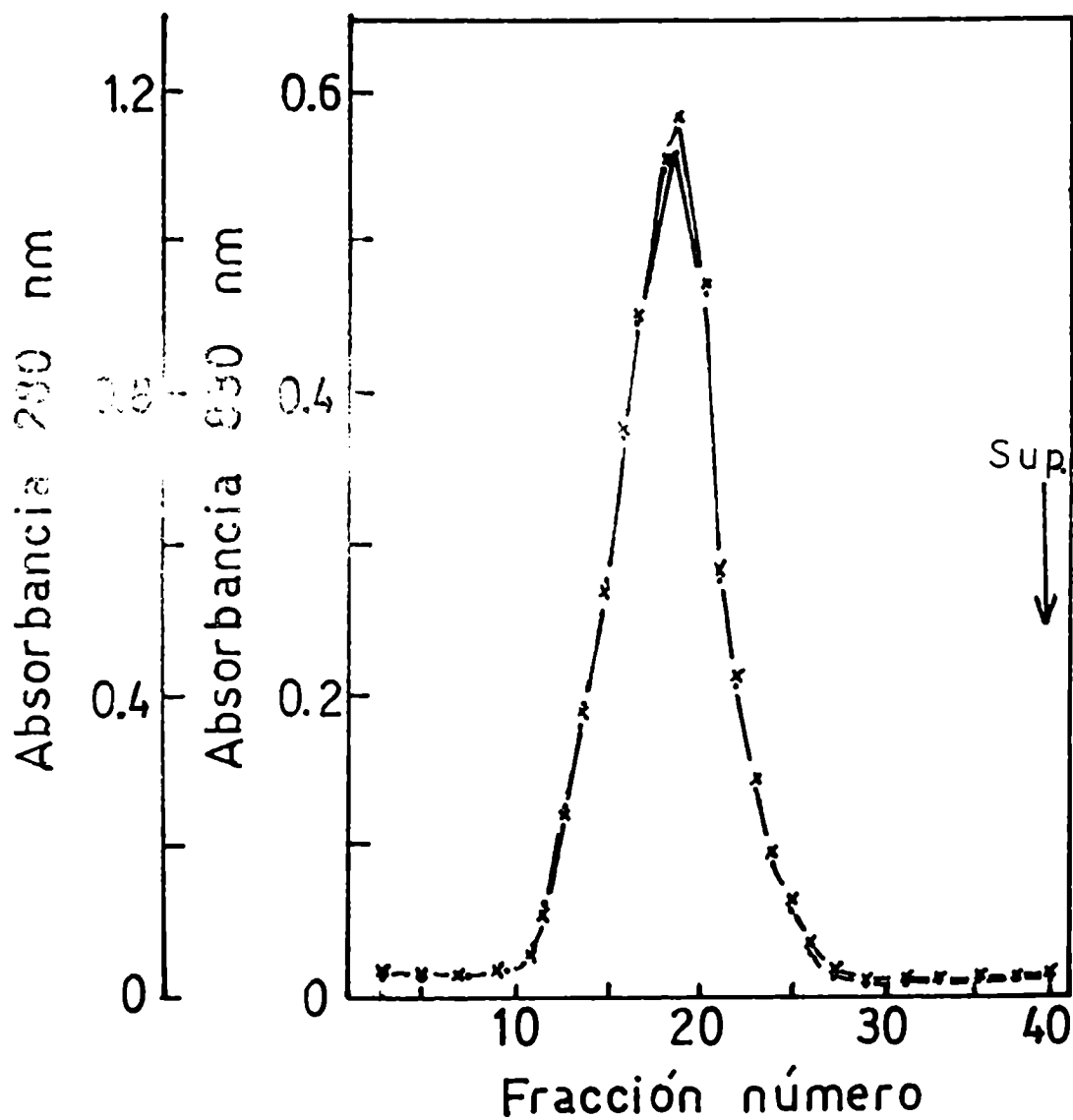


Figura 42:

Centrifugación en gradiente continuo de sacarosa (0.1 - 0.4 M) del CR. Se centrifugó 17 hs. a 250.000 g en el rotor SW50. (x—x) Absorbancia a 830 nm, (•—•) Absorbancia a 280 nm.

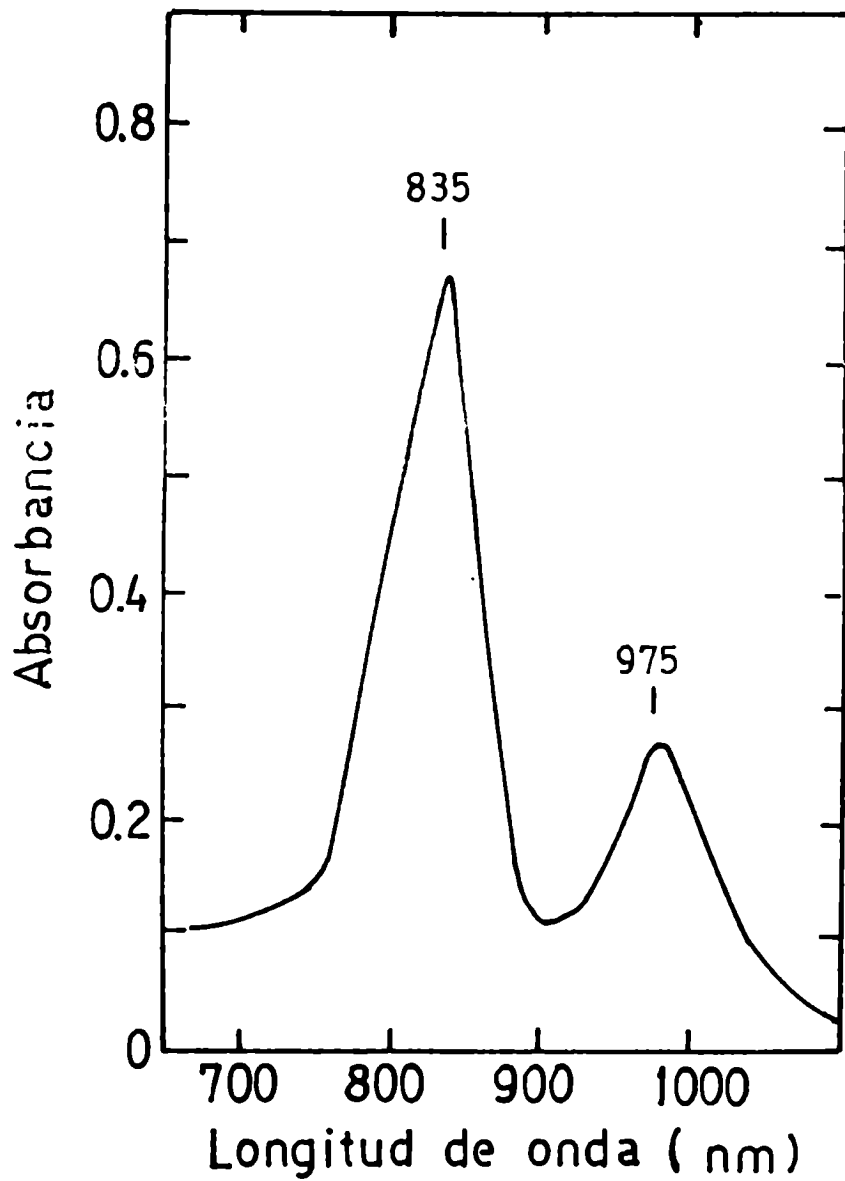


Figura 43:

Espectro de absorción en el IR cercano del CR purificado por el procedimiento B.

- a) Su espectro de absorción: ausencia de banda de absorción a 685 nm (figura 43).
- b) Presencia de una única banda en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no disociantes cuyo perfil de absorbancia a 560 nm y a 280 nm en función de la distancia de migración se puede ver en la figura 44.
- c) Presencia de una sola banda a 280 nm coincidente con la que absorbe a 830 nm en un gradiente de sacarosa (Figura 42).

En el tercer procedimiento de purificación del CR (Procedimiento C), también se utiliza LDAO para la disolución de la membrana.

La membrana redisuelta así obtenida, se somete a una cromatografía de intercambio iónico (DEAE celulosa) previa diálisis contra el buffer de equilibrio de la columna.

Con el buffer de equilibrio eluyen de la columna 2 fracciones, la primera, que eluye muy rápidamente, es una fracción verde, cuyo espectro de absorción en el IR cercano da una única banda a 685 nm lo que nos indica que es Bchl antenna, la segunda fracción verde-marrón que también eluye con el buffer de equilibrio como una sola banda pigmentada tiene un espectro en el IR cercano que presenta 3 bandas situadas a 685 nm, 810 nm y 860 nm. Esta última fracción no fue posteriormente investigada.

La fracción que contenía el CR quedaba aún retenida en la columna de DEAE celulosa, experimentalmente se encontró que eluía con una concentración de CINA de 0.15 molar.

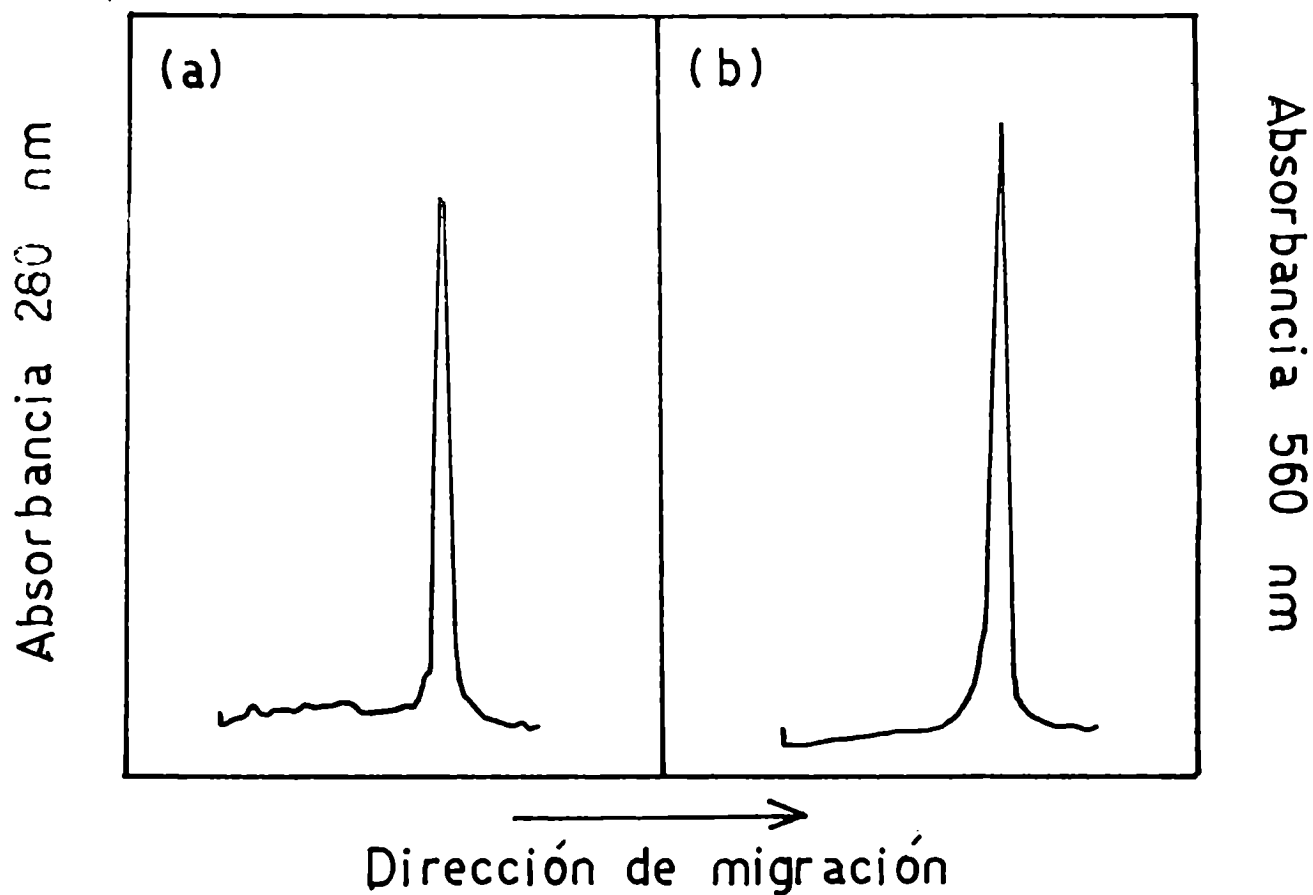


Figura 44:

Electroforesis en gel de poliacrilamida con LDAO, del CR purificado. (a) Perfil de absorbancia a 280 nm en función de la distancia de migración. (b), perfil de absorbancia a 560 nm en función de la distancia de migración.

Las fracciones que contenían CR eluidas de esta forma, presentan un espectro en el IR cercano muy semejante al de la figura 40.

Si esta preparación se somete a centrifugación en gradiente continuo de sacarosa como en el procedimiento B, se obtiene una preparación de CR purificado cuyo perfil de absorbancias en función del número de fracciones, y cuyo espectro de absorción en el IR cercano son idénticos a los mostrados en las figuras 42 y 43 respectivamente.

De la comparación de los 3 métodos de purificación surge que el uso de un detergente no iónico como LDAO es más apropiado para la preparación de CR, que detergentes iónicos como SDS, ya que mediante este último, no es posible la separación total de la Bchl antenna. Respecto a los 2 procedimientos utilizando LDAO, la pureza de la preparación de CR obtenida en ambos es idéntica siendo el procedimiento C bastante más sencillo.

2.- Composición proteica del centro de reacción.

a.- Centro de reacción obtenido por el procedimiento A.

Cuando la preparación de CR luego de la recromatografía en hidroxilapatita se somete a electroforesis en geles de poli-acrilamida se observa la presencia de 4 bandas proteicas que llamamos a; b; c y d.

En la figura 45a se puede ver el perfil de absorbancia a 560 nm en función de la distancia de migración, así como diagra-

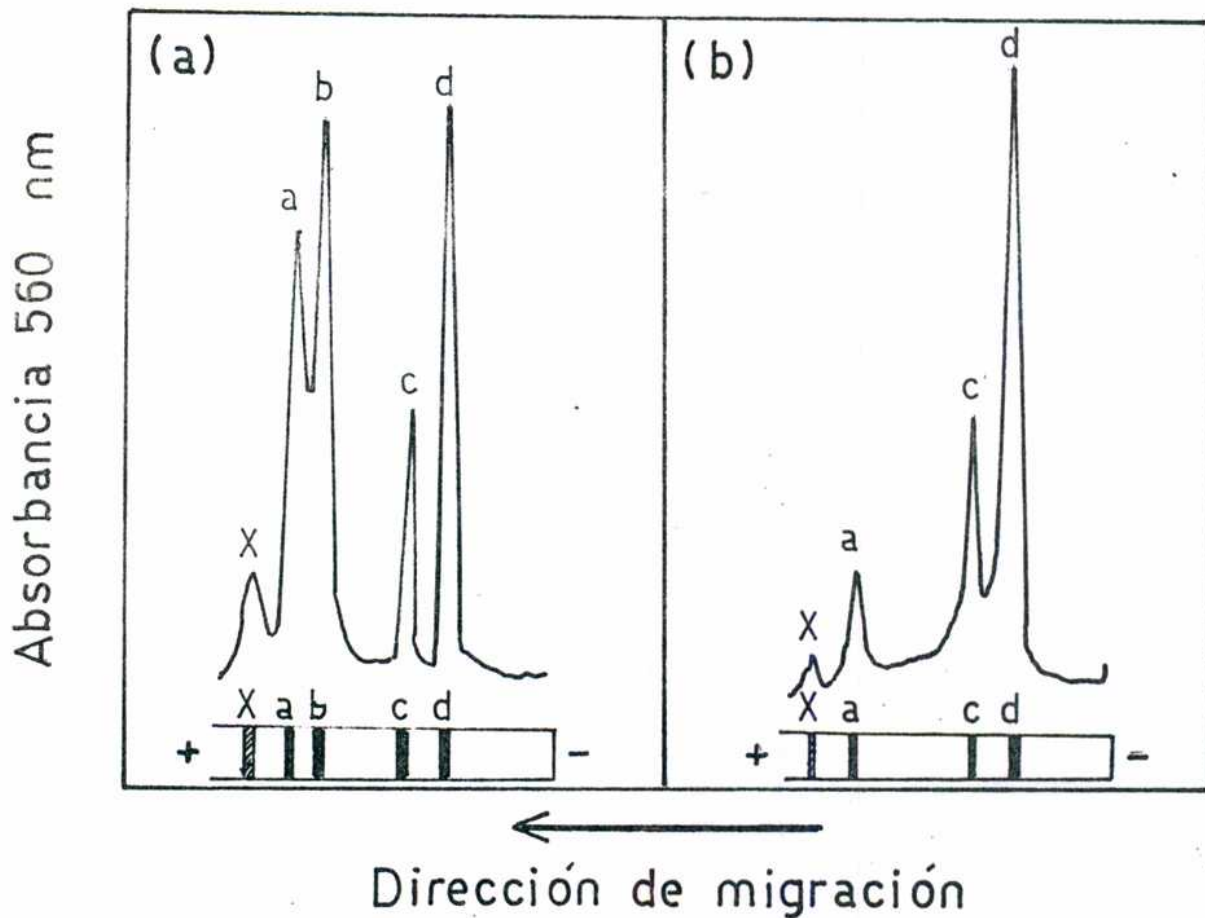


Figura 45:

Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. (a) perfil de absorbancia a 560 nm en función de la distancia de migración del CR obtenido luego de la recromatografía en hidoxilapatita (proc. A). (b) perfil de absorbancia a 560 nm en función de la distancia de migración del CR obtenido luego del gradiente de sacarosa AUT (proc. A). En ambos casos los gels contienen 0.4% SDS y las muestras fueron tratadas con 0.4% SDS y 0.4% ME.

ma del gel teñido.

Una electroforesis en gel de poliacrilamida de la preparación de CR luego del gradiente de sacarosa AUT (figura 45b), revela la presencia de 3 bandas proteicas cuyas movilidades electroforéticas comparadas con las de la figura 45a corresponden a las bandas a; c y d. Como se verá más adelante esta preparación es inactiva fotoquímicamente, y la pérdida de actividad respecto al paso anterior de purificación coincide con la desaparición de la banda b en los geles de poliacrilamida. Estos resultados concuerdan con la hipótesis de una "unidad fotoreceptora", propuesta por Loach y colaboradores (101; 102), que combina la actividad cosechadora de luz y la función fotoquímica, para la preparación obtenida antes del gradiente AUT (Figura 45a).

b.- Determinación del PM de las subunidades del CR bajo diferentes condiciones disociantes.

La validez del método de geles de poliacrilamida con SDS para determinar pesos moleculares ha sido bien establecida para muchas proteínas hidrofílicas (104; 121).

Sin embargo, su aplicación para proteínas altamente hidrofóbicas, como las del CR no está aún definida. Referente a esto último Okamura y colaboradores (17) han determinado que los valores de pesos moleculares relativos obtenidos por este método son más confiables que sus valores absolutos.

Utilizando este método se han calculado los pesos molecu-

lares relativos, de las diferentes subunidades del CR purificado por el procedimiento B luego de un tratamiento con diferentes concentraciones de SDS y en presencia o ausencia de 1% ME.

La figura 46 muestra los diferentes perfiles polipeptídicos obtenidos registrando los geles, inmediatamente después de corridos, a 280 nm.

El método y las condiciones de corrida utilizados en la electroforesis están descritos en detalle en MATERIALES Y METODOS, el buffer usado en estos experimentos fue Tris-ClH 50 mM pH 8.0.

Es interesante destacar que las curvas de calibración de los geles de poliacrilamida fueron hechas para cada condición de disociación, ya que se observó que la movilidad relativa de las diferentes proteínas usadas como standards, varía al cambiar la concentración de SDS en el gel y en el buffer de corrida.

Cuando una muestra de CR purificado se trata con 0.05% SDS y en ausencia de ME, y se corre bajo esas mismas concentraciones de los agentes disociantes (Figura 46A) se detecta una banda principal (banda a) y cuatro bandas proteicas adicionales de menor intensidad. Los pesos moleculares relativos, calculados de la curva de calibración correspondiente (figura 12) son: 130, 100, 76, 57 y 45 Kdalton respectivamente.

Cuando la muestra se trata con la misma concentración de SDS pero adicionando 1% ME (figura 46B), la banda de 130 Kdalton decrece en intensidad y se ven sólo 3 bandas adicionales (bandas f, g y h), cuyos pesos moleculares, calculados de la curva de calibración correspondiente (Figura 12) son: 45, 37 y 29 Kdalton

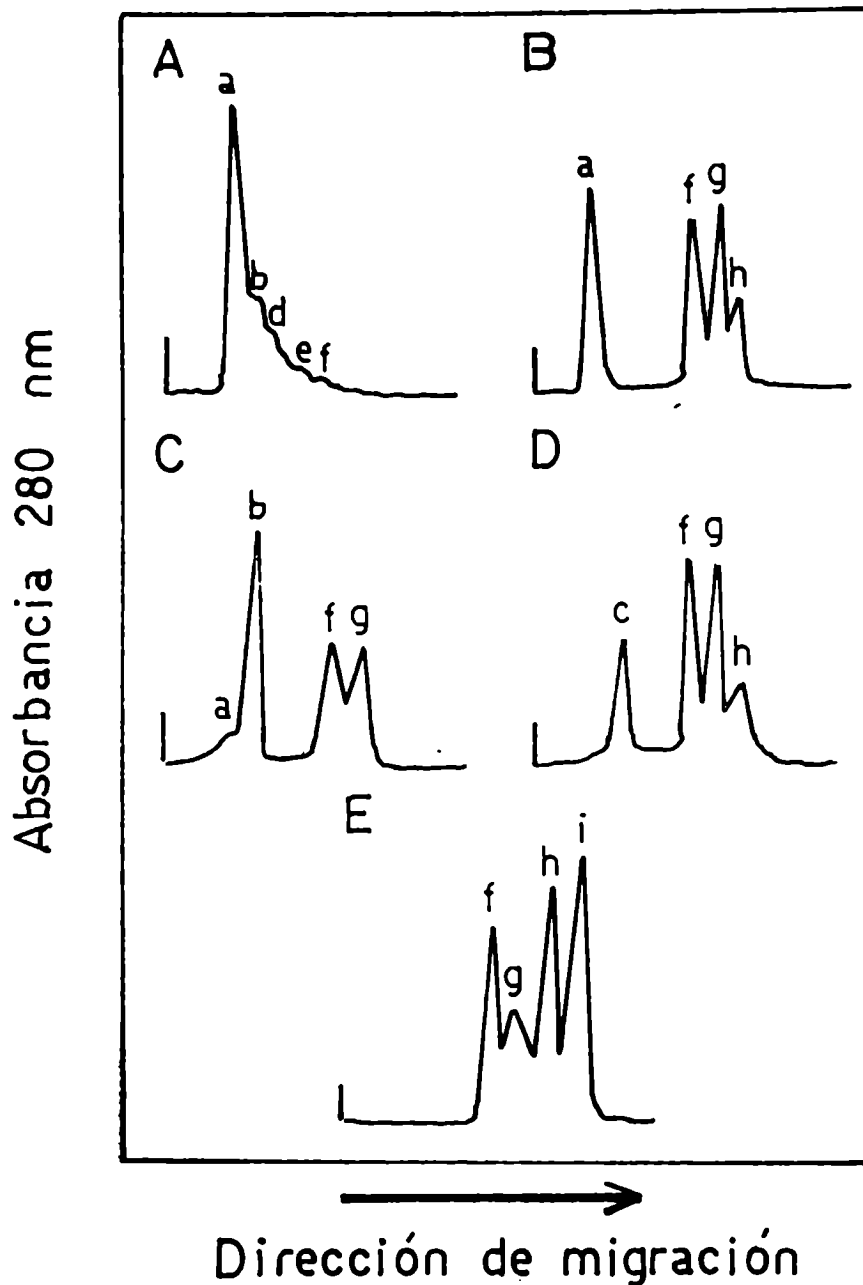


Figura 46:

Electroforesis en gel de poliacrilamida del CR (Proc. B) bajo diferentes condiciones disociantes. (A), CR tratado con 0.05% SDS, (B), CR tratado con 0.05% SDS, 1.0% ME. (C), CR tratado con 0.1% SDS. (D), CR tratado con 0.1% SDS, 1.0% ME. (E), CR tratado con 0.5% SDS, 1.0% ME. En todos los casos los gels se registraron a 280 nm.

respectivamente.

Cuando la concentración de SDS se aumenta a 0.1% en ausencia de ME (Figura 46C), se detectan 4 bandas, la primera correspondiente a 130 Kdalton, una banda principal (b) de 100 kdalton, y otras dos menores (f y g) de 45 y 37 kdalton (calculados de la curva de calibración de la figura 13).

Cuando la concentración de SDS se mantiene en 0.1% pero se adiciona 1% ME a la muestra (Figura 46D) se obtiene un perfil similar al de la figura 46B, excepto que aparece una nueva forma proteica (banda c) con un peso molecular de 92 Kdalton (calculado según la curva de calibración de la figura 13).

Cuando la concentración de SDS se hace aún más alta, manteniendo la misma concentración de ME (0.5% SDS y 1.0% ME) (Figura 46E), se detectan 4 bandas proteicas (f, g, h e i), cuyos pesos moleculares (calculados de la curva de calibración de la figura 14) son: 45, 37, 29 y 23 Kdalton.

Un incremento posterior en la concentración de SDS y/o ME no produce ningún cambio en la composición proteica.

De estos datos, resulta que, para tener una total disociación del complejo, la concentración de SDS debe ser 0.5% o mayor y la de ME de 1.0% o mayor, así a bajas concentraciones de los agentes disociantes se obtienen gran cantidad de polipéptidos de alto peso molecular y esta cantidad decrece al aumentar la concentración de dichos agentes.

Referente a la composición proteica del CR aislado de otras bacterias fotosintéticas, Okamura y colaboradores (17) determina-

ron que la partícula aislada de Rps. spheroides y R. rubrum está formada por sólo 3 polipéptidos diferentes. Nieth y colaboradores (122) describieron una situación similar para el CR aislado de Rps. capsulata.

3.- Actividad fotoquímica del centro de reacción purificado.

La actividad fotoquímica del CR se pone de manifiesto, midiendo los cambios de absorbancia ópticos reversibles inducidos por iluminación, ésto es: una disminución de absorbancia de la banda a 975 nm y un corrimiento hacia el azul de la banda a 835 nm.

La figura 47 muestra un espectro en el IR cercano del CR purificado (procedimiento B) junto con un barrido de longitud de onda en la misma zona del espectro, pero con la preparación sometida a iluminación continua. Se puede observar que estas preparaciones de CR son activas fotoquímicamente. Esto es debido a la oxidación de la Bchl por la luz y la consiguiente re-reducción del pigmento en oscuridad.

Para estudiar la cinética de reversibilidad del proceso fotoquímico, hemos seguido el cambio de absorbancia a una longitud de onda fija (975 nm), sometiendo la muestra a pequeños períodos de luz y oscuridad. En el extremo superior derecho de la figura 47 se muestran los resultados de este experimento.

Se observa que iluminando la muestra, se produce una inmediata caída de absorbancia a 975 nm; que se mantiene hasta que la

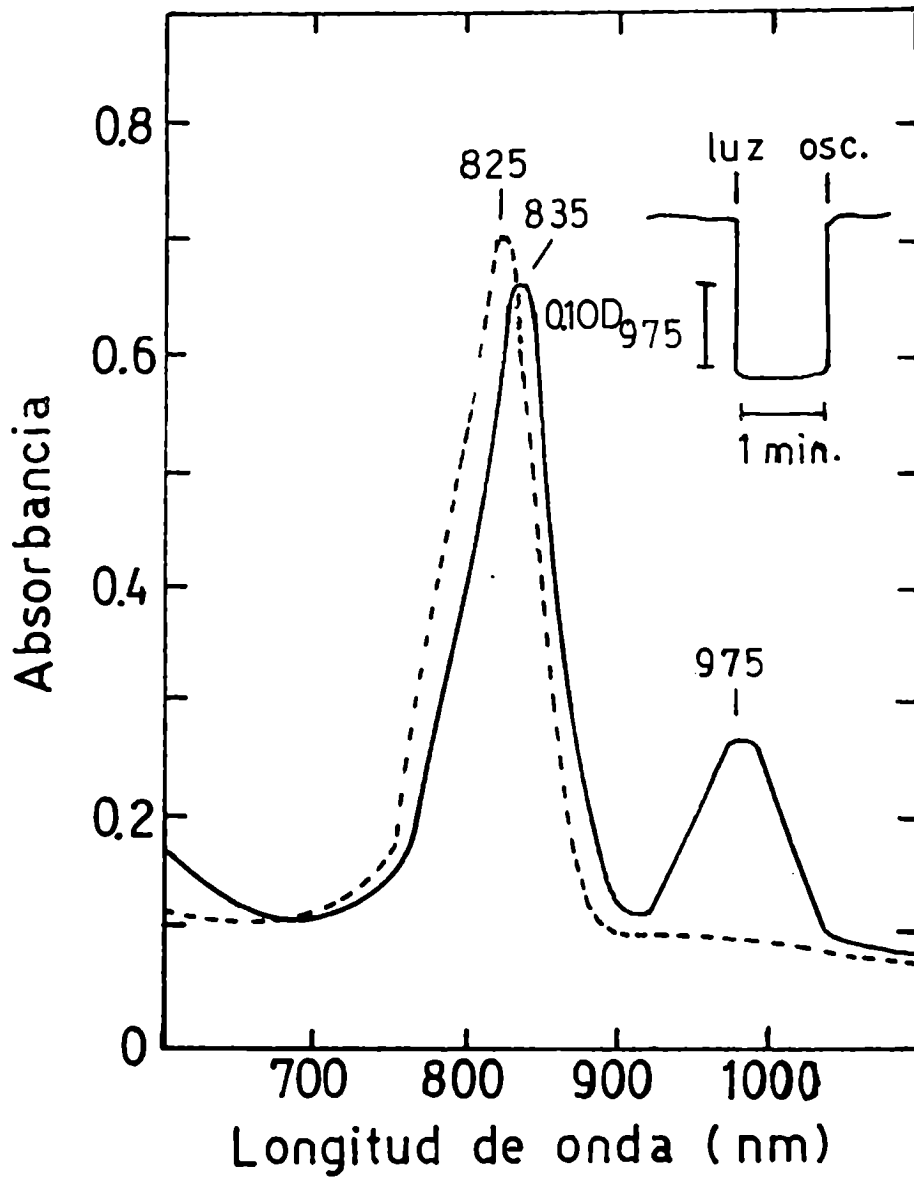


Figura 47:

Espectro de absorción en el IR cercano del CR (Proc. B), en la luz (-----) y en la oscuridad (——). En el extremo superior derecho se muestra el bleaching inducido por la luz a 975 nm.

luz se apaga, en ese momento ocurre una también rápida recuperación del valor de absorbancia al nivel original en la oscuridad, y este experimento se puede repetir varias veces sin que se modifique la cinética del proceso.

Cuando se estudió la actividad fotoquímica del CR purificado por el procedimiento A, se encontró que esta preparación fue inactiva.

Experimentalmente se comprobó que la pérdida de actividad ocurre en el último paso de la purificación (gradiente de sacarosa AUT).

Sin embargo cuando el CR purificado por los procedimientos B ó C se somete a este mismo gradiente de sacarosa, la fracción CR que se obtiene mantiene su actividad fotoquímica y su cinética de reversibilidad.

La preparación de CR obtenida luego de la recromatografía en hidroxilapatita (procedimiento A) mostró ser activa fotoquímicamente. La figura 48 muestra el espectro de absorción en el IR cercano, en oscuridad y bajo iluminación continua, obtenido para el CR en esta etapa de purificación.

En este caso, a diferencia de las preparaciones obtenidas por los procedimientos B ó C, el CR oxidado por la luz, muestra una muy lenta recuperación en oscuridad, tarda aproximadamente 15 minutos para reestablecer totalmente el espectro de absorción original, esto también fue descrito por Thornber y colaboradores (99).

Es importante destacar que sí la preparación del CR activa

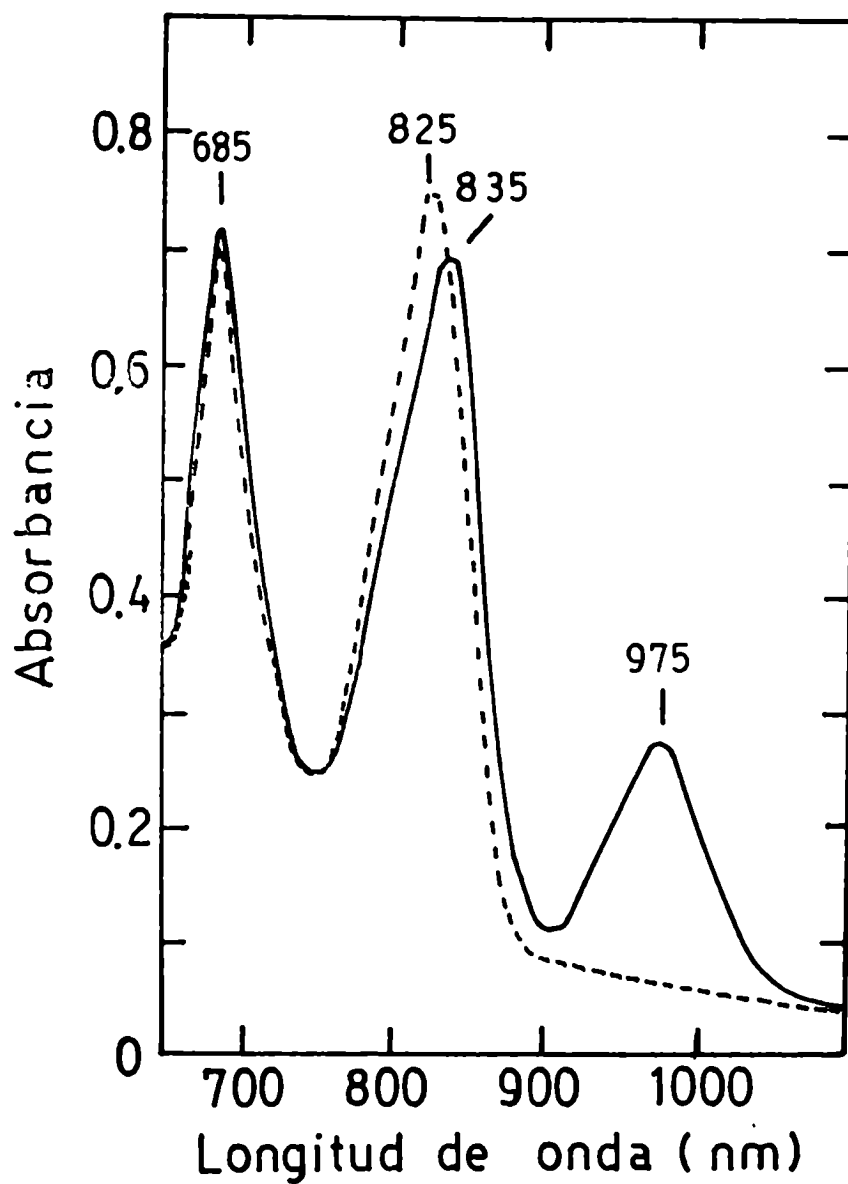


Figura 48:

Espectro de absorción en el IR cercano de la preparación activa obtenida por el procedimiento A (recromatografía en hidroxilapatita), en la luz (-----), y en la oscuridad (—).

fotoquímicamente (obtenida por el procedimiento A), se incubaba en presencia de Tritón X100 y urea en medio alcalino, en las mismas concentraciones presentes en el gradiente de sacarosa AUT, también se produce una inhibición total de la actividad fotoquímica, esto podría ser el resultado de una disociación de la banda b del complejo, produciéndose de esta manera, la inhibición de la actividad.

4.- Determinación de la estequiometría de las subunidades del centro de reacción purificado.

Estos experimentos se realizaron con preparaciones obtenidas por el procedimiento B.

Mediante geles de poliacrilamida corridos en la condición que da la máxima disociación del complejo (0.5% SDS y 1.0% ME) se ha calculado la estequiometría de los diferentes polipéptidos (banda f, g, h é i) registrando los geles recientemente corridos a 280 nm y después de teñidos con Coomassie blue, a 560 nm. En la figura 49 se muestran los perfiles obtenidos. Calculando el área bajo las diferentes bandas en la figura 49a, se obtuvo una estequiometría de 2:1:2:2, para las bandas f, g, h é i, lo que corresponde a un peso molecular mínimo para la partícula entera, de 231 Kdalton.

En cambio, si por el mismo procedimiento, calculamos la estequiometría en los geles luego de teñidos, registrándolos a 560 nm da una relación de 2:1:1:1 lo que correspondería a un peso molecular mínimo de 179 Kdalton para el complejo.

También se trató de determinar la estequiometría del comple-

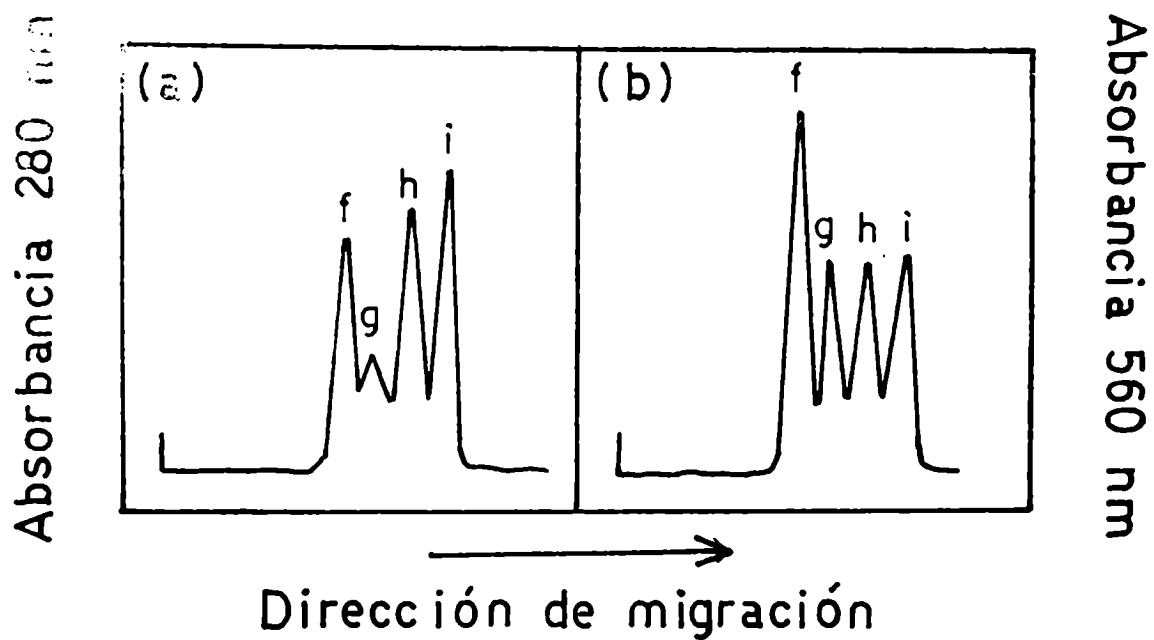


Figura 49:

Electroforesis en gel de poliacrilamida. Estequiometría de las subunidades del CR corrido en la condición de máxima disociación (0.5% SDS, 1.0% ME). (a) perfil de absorbancia a 280 nm en función de la distancia de migración. (b), perfil de absorbancia a 560 nm en función de la distancia de migración.

jo utilizando el método radioactivo. Con preparaciones de CR purificadas de células crecidas con una mezcla de amino-ácidos marcados (C^{14}), se corrieron geles de poliacrilamida en la condición de máxima disociación del complejo, y se midió la radioactividad incorporada a cada una de las bandas; pero este método resultó estar sujeto a un error considerable: a) porque diferentes corridas de la misma preparación, no dieron resultados reproducibles, b) porque la recuperación del material radioactivo en las 4 bandas fue sólo 60% del originalmente aplicado a los geles, c) porque la pérdida de radioactividad no fue la misma proporcionalmente en las 4 subunidades.

Debido a que la cantidad de colorante, Coomassie blue, fijado por diferentes subunidades no es proporcional a la cantidad de proteína (17), tendemos a favorecer la estequiometría resultante del registro de los geles a 280 nm.

El peso molecular mínimo así calculado para el complejo (231 Kdalton) concuerda perfectamente con el obtenido por filtración en gel para la partícula intacta.

5.- Determinación del peso molecular del complejo centro de reacción por filtración en gel.

El peso molecular del complejo intacto fue determinado por cromatografía en columna a través de 2 soportes diferentes; Sepharosa 6 B y Bio gel P 300 (EN MATERIALES Y METODOS está descrito en detalle el método usado, como así también las curvas de cali-

bración obtenida con diferentes proteínas puras de peso molecular conocidos, usadas como standards).

Los valores de peso molecular obtenidos son: $230^{\pm} 10$ Kdalton, cuando se usó Sepharosa 6 B y $240^{\pm} 10$ Kdalton, para el caso del Bio gel P 300. Comparando estos valores con el obtenido de la estequiometría de las diferentes subunidades se ve que son muy semejantes.

6.- Presencia de citocromos en el centro de reacción.

La presencia de citocromos, en la preparación pura de CR se determinó mediante los espectros de diferencia de la preparación reducida con tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) versus el CR no tratado y de la preparación reducida con tiosulfato versus la oxidada con ferricianuro de potasio ($\text{K}_3\text{Fe CN}_6$). El espectro de diferencia que se obtiene, revela la presencia de dos citocromos: C_{553} y C_{558} . El C_{553} está oxidado mientras que la mayoría del C_{558} se encuentra reducido.

Del espectro de diferencia y usando el coeficiente de extinción molar (E_M) de 2×10^4 (99) calculamos la siguiente relación molar: Bchl/citocromo C_{558} /citocromo C_{553} (2.8:1:0:3). Este resultado es diferente al mostrado por Feher (15) para el CR de Rps. spheroides R26 y por Noel y colaboradores (123) para la cepa salvaje de R. rubrum. En cambio, Reed y Clayton (12); Reed (13) y Thornber y colaboradores (99) han determinado la presencia de citocromos en sus preparaciones obtenidas utilizando SDS.

7.- Presencia de quinonas en el centro de reacción purificado.

García y colaboradores en 1968 (124) observaron la presencia de 2 quinonas diferentes en Rps. viridis, una de ellas, correspondiente a la Ubiquinona, probablemente Q_6 , y la otra mostraba un espectro de absorción semejante al publicado por Dunphy y Brodie (125) para la menaquinona.

Usando un $E_M 245nm = 26.481$ para la menaquinona, resultó que en la preparación de CR teníamos 1.25n moles/mg proteína.

Para comparar, determinamos la cantidad relativa en membrana lavada que resultó ser: 0.55nmoles/mg proteína.

Por otro lado, no fue posible detectar ubiquinona en el CR mientras que su concentración en membrana lavada fue de 5.3 n moles/mg proteína.

En la figura 50 se puede ver el espectro de absorción de las quinonas del CR y su espectro de diferencia luego de reducirlos con borohidruro de sodio.

Estos resultados indican que la menaquinona está más íntimamente relacionada a la partícula fotoquímicamente activa.

También se determinó en forma cualitativa la presencia de Bpheo en el CR.

Resumiendo, estos resultados muestran que se ha purificado un complejo CR fotoactivo que contiene Bchl, Bpheo, citocromos y menaquinona. Si el PM calculado por filtración en gel es correcto (240 Kdalton aproximadamente), la partícula aislada tiene por mol de CR:

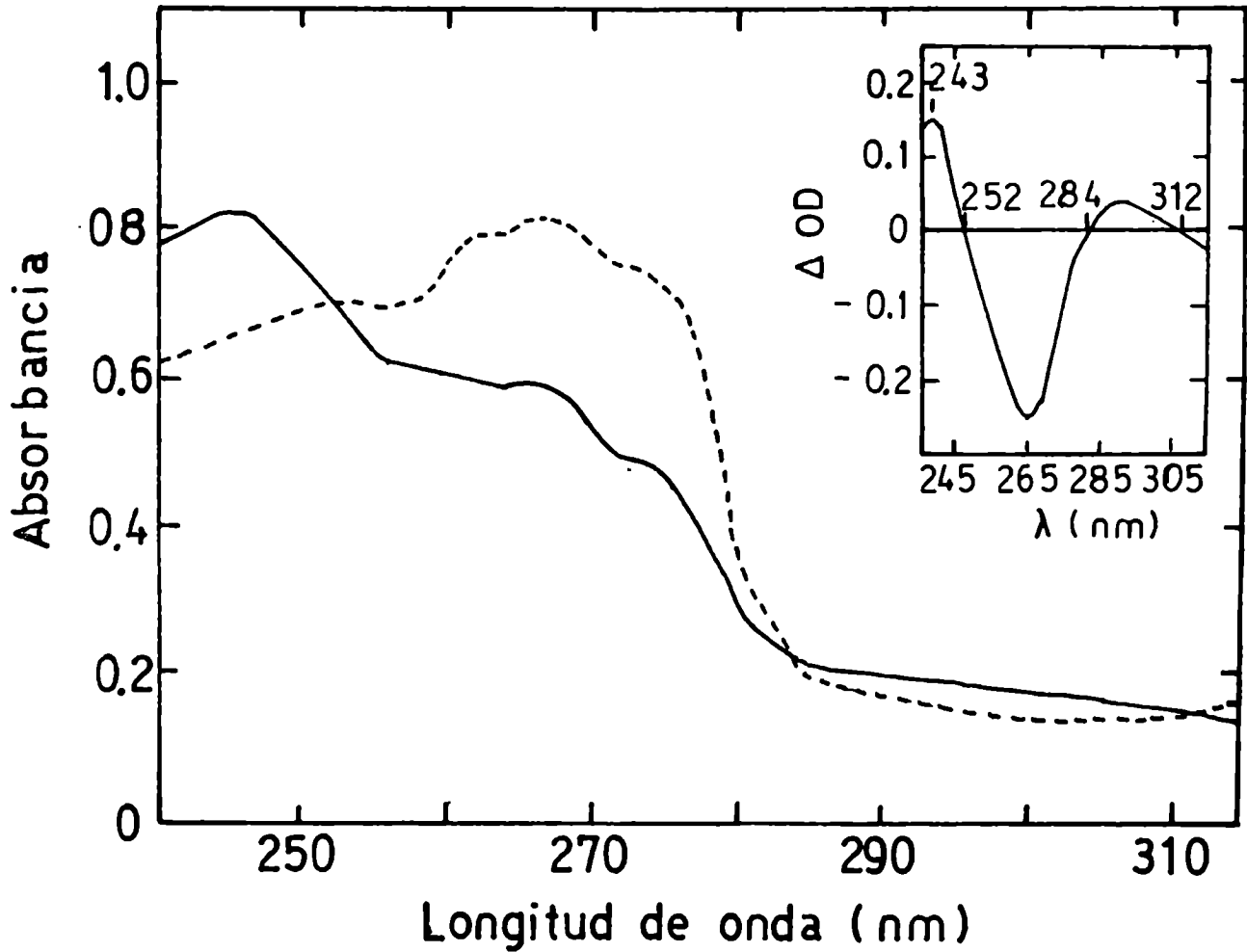


Figura 50:

Espectro de absorción de las quinonas del CR purificado. (—), no tratado. (- - - -), tratado con borohidruro de sodio. En el extremo superior derecho se muestra el espectro de diferencia.

)

2.93 moles de Bchl (12,3 n moles Bchl/mg proteína)

0,3 moles menaquinona.

1.05 moles citocromo C₅₅₈.

0.35 moles citocromo C₅₅₃.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A.- Influencia de factores externos sobre la membrana de Rps. viridis in vitro e in vivo

De los resultados obtenidos de los experimentos de centrifugación en gradiente de sacarosa de extractos libres de células se observa la presencia de fracciones de membrana que tienen diferentes valores de S, aunque presentan la misma densidad.

Cuando se someten las membranas a cambios en las condiciones ambientales tales como a) eliminación del sobrenadante, por lavado exhaustivo ó b) presencia de iones Mg^{2+} , se observa que se afecta el estado de agregación de esas fracciones de membrana. La agregación que se produce por el lavado es probablemente el resultado de la eliminación de proteínas solubles, ya que la separación de iones metálicos residuales (dializando la membrana contra agua o buffer), no introduce ninguna modificación substancial en el perfil de la distribución de pigmentos en el gradiente.

Es un hecho conocido que la presencia de iones Mg^{2+} es necesaria para la reagregación de membranas que han sido solubilizadas con SDS a pH neutro (126), Rottem y colaboradores (127) han mostrado que cuánto más bajo es el pH del sistema, menor es la cantidad de Mg^{2+} re-

querida para la reconstitución de membranas previamente solubilizadas, porque se facilita de esta manera las interacciones no iónicas entre las membranas neutralizadas.

Un efecto similar se observa cuando la PMC se dializa contra Mg^{2+} , ó se lava con un buffer que contiene Mg^{2+} , así es que en el gradiente de sacarosa se detecta una única banda pigmentada. En este caso, también se observa una agregación espontánea de las membranas sonificadas a pH menores que 4.5.

Esto podría indicar que el proceso de agregación que se observa en presencia de iones Mg^{2+} puede ser debido a interacciones no iónicas entre distintos pedazos de membrana.

Además, obviamente, hay una interacción de iones Mg^{2+} con la membrana que resulta en una modificación estructural que se pone de manifiesto por el cambio en el valor de S del material pigmentado.

Muy probablemente las proteínas del sobrenadante actúen, incrementando las fuerzas eléctricas repulsivas entre las diferentes piezas de la membrana. Si este fuera el caso, la carga neta de las proteínas solubles, debería tener fundamental importancia en el fenómeno de agregación.

Para probar esta posibilidad, es que se ha lavado la membrana con una solución de dos diferentes proteínas puras, con muy distintos puntos isoeléctricos. Así, se usó citocromo c, que es una proteína muy abundante en las membranas fotosintéticas y en el citoplasma celular, y albúmina de suero bovino. El citocromo c se comporta como el Mg^{2+} , esta molécula proteica está positivamente cargada al pH usado en el experimento, entonces es posible postular que actúe como un

punte entre los grupos negativamente cargados, presentes en la membrana, permitiendo que tengan lugar fuerzas de agregación no iónicas. Por el contrario, la BSA impide el fenómeno de agregación. La acción de la BSA puede explicarse como aumentando las fuerzas repulsivas que tienen lugar entre los fragmentos de la membrana. De estos resultados se deduce que las interacciones: i) membrana negativamente cargada - iones metálicos y ii) membrana-proteínas solubles, tienen algún importante rol funcional. En relación con esto, se debe recordar que la unión de proteínas a membrana es un fenómeno bien conocido. De los datos presentados por Racker y colaboradores (128) y Abrams y Baron (129), resulta claro que existe alguna especificidad en la unión de proteínas a la membrana.

De los experimentos presentados surge, como conclusión, que en este caso el término "fracción de membrana", es sólo una definición operacional ya que el número y las propiedades estructurales de esas fracciones son función del procedimiento de obtención.

En 1971 Niederman y Gibson (130) mostraron que el aparato fotosintético en Rps. spheroides está contenido en una única banda pigmentada que se puede separar de la cubierta celular, cambiando las condiciones ambientales. Ellos atribuyen el cambio en la posición de la banda pigmentada en el gradiente a la permeabilidad de esas estructuras, a las especies iónicas.

Por el contrario, nuestros resultados indicarían, que el efecto del Mg^{2+} no ocurre a través de la manifestación de fenómenos de permeabilidad, ya que entidades cargadas de muy diferentes pesos moleculares, producen efectos de agregación similares, como es el caso del

citocromo c y del Mg^{2+} .

De acuerdo con las modernas teorías de la fosforilación oxidativa o de fotofosforilación, se sabe que para que ocurra conservación de energía es necesario que las organelas que producen estos fenómenos, sean entidades topológicamente cerradas. Así, en efecto, la teoría quimiosmótica de la formación de ATP requiere una redistribución de cationes conjuntamente con el establecimiento de un gradiente de pH a ambos lados de una organela del tipo de las mitocondrias, cloroplastos ó tilacoides de bacterias fotosintéticas.

Coincidentemente, resultados experimentales obtenidos por nosotros, muestran que la PML de Rps. viridis presenta una muy baja actividad de fotofosforilación (131). Esto podría ser interpretado como si en estas preparaciones de membrana, producidas a través de la sonicación de células, existiera una mezcla más ó menos inhomogénea de grados de integridad diferente de las membranas recuperadas. Así, si se someten las membranas a una centrifugación en gradiente de sacarosa, por cortos tiempos, y se selecciona material proveniente de fracciones que tienen diferente tamaño molecular, se ve que hay una disparidad muy grande en la actividad de fotofosforilación.

De esta discusión queda bien establecida la posibilidad de asignar roles específicos para las interacciones de la membrana con proteínas del sobrenadante. En particular se trató el caso del citocromo c por ser una proteína que se encuentra en abundancia en forma soluble y particulada. Estos datos, dan cuenta, por lo tanto, de las posibles modificaciones de estas membranas fotosintéticas "in vitro".

Los próximos resultados, por el contrario, al estudiar el efecto de las condiciones ambientales de crecimiento de las células, dan obviamente, idea de modificaciones que se producen "in vivo". De los resultados obtenidos del estudio comparativo de membranas de Rps. viridis crecidas en presencia y en ausencia de extracto de levadura, se deduce que la ausencia de ácido p-amino benzoico induce un cambio profundo en algunos de los parámetros que caracterizan a estas membranas. Se observa una diferente sensibilidad hacia el tratamiento mecánico (sonicación), ya que las subfracciones de membrana obtenidas de células crecidas en ausencia de p-ABA presentan menores valores de S.

El proceso de biosíntesis de las membranas de bacterias fotosintéticas ha sido estudiado fundamentalmente en el caso de Rps.spheroideis y R. rubrum (98, 113 - 116) en los cuales el crecimiento de las membranas tilacoides, se produce por sucesivas invaginaciones y alargamientos de la membrana citoplasmática, dando lugar a lo que se conoce como membrana intracitoplasmática. Como se sabe, esto conduce a una serie cada vez mayor de puntos débiles, o de más fácil ruptura, aunque el número de éstos permanece constante con respecto al número total de partículas. En el caso de Rps. viridis crecido en las condiciones mencionadas, (ausencia de p-ABA en el medio de cultivo) no se sabe como se produce el crecimiento de las membranas tilacoides, pero debe necesariamente involucrar una serie de pliegues y repliegues de la membrana citoplasmáticas. Pudiera ser que nuestros resultados mostrarán un aumento relativo de la cantidad de sitios lábiles, por plegamiento imperfecto de las membranas; lo que resultaría en un aumento

del número de partículas con tamaño menor. Obviamente, la variación de la composición química de la membrana y por consiguiente su disposición estructural debe contribuir a este aumento observado en los sitios débiles. En relación a esto, vimos que aunque ambas membranas poseen una composición lipídica cualitativamente similar, en ausencia de extracto de levadura, la cantidad de lípido a ornitina es mucho menor y esta disminución es paralela a la disminución observada en el contenido específico de Bchl. Se sabe que el ácido fólico y el p-ABA son importantes coenzimas en el metabolismo de los fragmentos de un átomo de carbono, que llevan a la formación de purinas, timina, ácido pantoténico y metionina. De los resultados presentados, se ve que la carencia de ácido fólico ó p-ABA en el medio de cultivo, afectan el contenido específico de Bchl de la célula, es posible entonces, que la caracterización de la membrana "anormal" resultante sea útil para determinar la relación existente entre la composición química y las propiedades físicas.

Existen varias hipótesis que aclararían la razón de la disminución observada en el contenido de Bchl. 1) Una disminución en la disponibilidad de metionina podría resultar en una concentración disminuída de S-adenosil metionina, y ésto afectaría el normal funcionamiento de la S-adenosil metionina: magnesio protoporfirina metil transferasa (98), y por consiguiente la síntesis normal de las clorofilas. 2) La disminución en el contenido específico de Bchl también puede deberse a la baja concentración de fosfatidiletanolamina y de lípido a ornitina. Estos dos lípidos proveerían las áreas específicas, dentro de la membrana básica, dando lugar a los sitios de

unión de la Bchl. En una mutante azul verde de R. rubrum (BGI), se ha aislado una fracción proteica que contiene lípido a ornitina y se ha postulado que su función es de constituir la "membrana básica" (132).

No es extraño que se manifieste una situación semejante, el modelo del mosaico fluido de la membrana indica (133) que una serie de componentes básicos distribuidos convenientemente, como bloques en una construcción, dan a la unidad fotosintética, las propiedades de antena para cosechar la luz y la actividad fotoquímica que conocemos. Estos bloques están formados por centros de reacción que contienen moléculasceptoras y donoras primarias de electrones, citocromos, que sirven como donores secundarios y complejos de Bchl-proteína que sirven como antena para cosechar la luz. Estas unidades básicas ó mosaicos, se mantienen unidas por componentes lipídicos que se pueden extraer fácilmente por detergentes solubilizantes. Branton y Park (134), para las lamelas fotosintéticas bidimensionales de las plantas superiores y Reed y colaboradores (135) y Slooten (50) para membranas bacterianas ó vesículas, han imaginado modelos semejantes a éstos. Modelos de este tipo, con grados variables de rigidez también han sido presentados para una amplia variedad de membranas subcelulares (136).

Así, la deficiencia en algunos lípidos polares podría perturbar el encajonamiento preciso de los bloques funcionales que contienen los pigmentos fotosintéticos, resultando en una membrana con una densidad (concentración de Bchl/superficie) menor. Indudablemente ésto resultaría en la formación de membranas más frágiles, que de

hecho, es observable. Es importante mencionar que el cambio en las condiciones nutricionales no afecta la relación: fósforo lipídico/proteína ni lípido a ornitina/Bchl. Esto indica una estricta correspondencia entre el lípido a ornitina y la Bchl, y entre los fosfolípidos y la proteína, y se puede interpretar como que las membranas de estas células crecidas en ausencia de p-ABA, estarían formadas por una red de fosfolípidos y proteína, semejante a la de las células crecidas en medio completo, pero a la que se le adicionarían, debido a una diferente disposición estructural, menores cantidades de lípidos a ornitina y consecuentemente menores cantidades de Bchl. Otro indicio para una diferente disposición macromolecular de estas membranas, es la obtención de una banda proteica que contiene carotenoides, cuando se las somete a gradientes de sacarosa, con Tritón X 100 y urea (gradiente AUT).

Hasta ahora, se ha analizado la composición lipídica de la membrana, del estudio de su composición proteica (por electroforesis en geles de poliacrilamida) se deduce que ambas membranas con cualitativamente similares, aunque la relación entre las diferentes bandas varía de una condición a otra, y ésto también puede ser interpretado como una diferente disposición macromolecular de las proteínas en las membranas que se obtienen alterando las condiciones de crecimiento de las células. Sin embargo, tampoco podemos descartar la posibilidad que algunas de las bandas proteicas que aparecen en los geles de poliacrilamida sean proteínas solubles inespecíficamente unidas a la membrana, ya que, de acuerdo a lo discutido al principio, pueden existir fuerzas iónicas que unan inespecíficamente proteínas a las

preparaciones de membranas lavadas. Por ésto resulta muy difícil y arriesgado correlacionar el cambio producido en el perfil proteico con el cambio observado en el contenido de Bchl ó lípidos.

El aislamiento de complejos Bchl-proteína, permitió clarificar los roles funcionales de alguna de las proteínas presentes en las membranas. Así las proteínas a y b (Figura 38) aparecieron siempre fundamentalmente asociadas a la Bchl antena. Sin embargo no se puede establecer definitivamente que esas sean las únicas proteínas directamente unidas a la Bchl, podría ser que "in vivo" algunas de las otras proteínas, también unidas a este complejo le confieran propiedades físicoquímicas adicionales.

Observando los espectros de absorción de las membranas aisladas de células crecidas en ambas condiciones se ve que son diferentes, presentando una banda extra el correspondiente a células crecidas en ausencia de p-ABA, ésto indica nuevamente que a pesar de tener una composición proteica cualitativamente similar, la disposición macromolecular de ambas membranas es diferente, y que la Bchl está embebida en un medio ambiente proteico diferente. Los complejos verdes (Bchl antena-proteína) aislados de ambos tipos de células tienen un espectro de absorción y una composición proteica diferente, contrariamente a lo que ocurre con los complejos CR, así es posible deducir que los cambios en las condiciones fisiológicas de crecimiento (como los estudiados) afectan independientemente la cantidad y el medio ambiente de la Bchl antena, sin afectar la cantidad y la actividad fotoquímica de los centros de reacción.

B.- Aislamiento del centro de reacción de Rps. viridis.

En los años 1963 y 1964, Clayton (137) y Kuntz y colaboradores (5) ya habían mostrado la posibilidad teórica de aislar centros de reacción de bacterias fotosintéticas. Estos complejos centros de reacción han sido purificados de varias bacterias fotosintéticas utilizando detergentes de distintos tipos: a) no iónicos, como Tritón X 100 (12; 13; 14; 113; 114; 138; 139), b) zwitteriónicos, como LDAO (15; 17; 122; 123; 140-142) y c) iónicos, como SDS (50; 99; 133; 143; 144).

En esta investigación se ha aislado y purificado el CR de Rps. viridis, utilizando SDS y LDAO.

Evidentemente, el tamaño y la composición de los centros de reacción depende del procedimiento empleado en su preparación. Como consecuencia de esto, la unidad "centro de reacción" no se puede definir en términos absolutos, sino sólo respecto a una preparación particular. Sin embargo debe existir una unidad de tamaño mínimo que todavía mantenga la actividad fotoquímica.

Mediante el empleo de SDS (procedimiento A), hemos aislado una partícula con actividad fotoquímica, pero con cantidades apreciables de Bchl antena. Loach y colaboradores (101-102), de sus resultados en Rps. spheroides y R. rubrum han propuesto la existencia de una "unidad fotoreceptora" que combina la actividad cosechadora de luz con la función fotoquímica.

Fraker y Kaplan (145; 146) postularon que la Bchl antena y las preparaciones de CR están asociadas a diferentes proteínas.

Nuestros resultados, con la preparación activa obtenida por el procedimiento A, tienden a favorecer la hipótesis de la "unidad fotoreceptora", dicha unidad estaría compuesta por las proteínas a; b; c y d (Figuras 45 (a) y 48) y tendría función fotoquímica y actividad cosechadora de luz. Sobre esta unidad se agregarían cantidades adicionales de Bchl antena y consecuentemente de proteínas a y b, dependiendo de los requerimientos fisiológicos.

La composición proteica de esta preparación de CR indica que son necesarias la presencia de las proteínas a; b; c y d para tener una preparación activa fotoquímicamente ya que la remoción de la banda b (gradiente AUT) provoca una completa pérdida de la actividad fotoquímica.

Por otro lado, si la preparación activa obtenida antes del gradiente AUT, se incuba con Tritón X 100 y urea a pH alcalino, (en iguales concentraciones que en el gradiente AUT), también se inhibe totalmente su actividad fotoquímica. Esto se interpreta como que en presencia de Tritón X 100 y urea, la banda proteica b se disocia del complejo macromolecular que forma la preparación activa y resulta en su inhibición.

Es interesante recalcar que la ausencia de la banda b no afecta el espectro de absorción del CR, lo que significa que sólo las bandas a, c y d y la interacción de alguno de sus grupos funcionales con el sistema de electrones π de la Bchl, contribuyen al espectro infrarrojo.

La preparación de CR obtenida utilizando LDAO (procedimiento B ó C) ha sido estudiada más detalladamente. De los resultados obte-

nidos sometiendo la preparación a electroforesis en geles de poliacrilamida se deduce que el complejo CR está formado por cuatro subunidades proteicas, y de las movilidades electroforéticas relativas resultan los siguientes PM: 45, 37, 29 y 23 Kdalton para las bandas f, g, h é i respectivamente (Figura 44).

Es interesante destacar que para obtener dicha disociación del complejo son necesarias concentraciones de SDS de 0.5% y de ME de 1%, a menores concentraciones de estos agentes disociantes se obtienen grandes cantidades de polipéptidos de alto PM que desaparecen al aumentar su concentración. Esta observación enfatiza la importancia de los puentes disulfuros en mantener la estructura cuaternaria del complejo.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Feher (15), Clayton y Haselkorn (46), Okamura (17) y Nieth y colaboradores (122), quienes determinaron la presencia de tres subunidades para los centros de reacción de Rps. spheroides R26, R. rubrum G9 y Rps. capsulata Ala⁺ R; y tampoco concuerdan con los obtenidos por Jolchine y Reiss-Husson (147), para Rps. spheroides, sólo que estos últimos autores se basaron sobre resultados obtenidos de electroforesis en geles de poliacrilamida, en PBS con 0.1% SDS; y nosotros no encontramos total disociación en esas condiciones.

La actividad fotoquímica del CR purificado se ha determinado, midiendo los cambios de absorbancia inducidos por la luz.

La preparación de CR purificada por el procedimiento A, luego del gradiente AUT, se vió que era inactiva fotoquímicamente y que esta pérdida de actividad estaba asociada a la posible disociación de una proteína del complejo (como se discutió antes), provocada por las con-

diciones del gradiente AUT. Sin embargo cuando se somete a este mismo gradiente, CR obtenido tratando las membranas con LDAO no se observa pérdida de actividad, ni modificación alguna en su composición proteica. Es posible que la presencia de LDAO en todo el proceso de purificación, proteja la integridad estructural del complejo no permitiendo ninguna disociación en presencia de Tritón X 100 y urea (en las condiciones del gradiente AUT).

También se observan diferencias en la cinética de reversibilidad del proceso fotoquímico; mientras que la preparación de CR obtenida mediante el uso de LDAO, presenta una rápida cinética en el cambio de absorbancia a 975 nm, la preparación activa (2da. hidroxilapatita) obtenida usando SDS, muy lentamente (aproximadamente 15 min.) reestablece el valor de absorbancia a 975 nm luego de transferir la preparación de luz a oscuridad, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Thornber y colaboradores (99) para CR aislado de la misma bacteria, usando SDS.

Dos posibles explicaciones, podrán aclarar este fenómeno:

- 1.- Que la preparación de CR obtenida en presencia de SDS tenga, como ya ha sido demostrado por Thornber y colaboradores (99) posibilidades de efectuar, aunque sea en forma incompleta un ciclo de transferencia de electrones, lo que provocaría un retardo en la reducción del CR en la oscuridad.
- 2.- Que la presencia de LDAO provoque una disminución substancial del tamaño del pool de aceptores secundarios con la concomitante interrupción del ciclo de transferencia de electrones, favoreciendo el flujo inverso de electrones del aceptor primario a la Bchl del CR.

De la determinación de la estequiometría de las subunidades del CR aislado utilizando LDAO, es posible calcular un PM mínimo de 231 Kdalton. Este valor concuerda perfectamente con el PM determinado para la partícula entera, por filtración en gel.

Si comparamos con los PM descritos por varios investigadores para preparaciones de CR libres de Bchl antena, obtenidos de diversas bacterias fotosintéticas (50; 140; 144; 148; 149) vemos que está dentro del orden de magnitud asignado a estas preparaciones.

Sin embargo, se debe recalcar que de los resultados de Thornber y Olson (149) resulta un PM de 110 kdalton para el CR aislado de Rps. viridis utilizando SDS, para la disolución de la membrana.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Duysens, L.N.M., Tesis (1952) Univ. de Utrecht.
- 2.- Duysens, L.N.M., Nature, 173, (1954), 692.
- 3.- Duysens, L.N.M., Brookhaven Symp. Biol., 11, (1958), 10.
- 4.- Goedheer, J.C., Biochim. Biophys. Acta, 38 (1960), 389.
- 5.- Kuntz, I.D., Loach, P.A. and Calvin, M., Biophys. J, 4, (1964), 227.
- 6.- Clayton, R.K., Photochem. Photobiol, 1 (1962), 201.
- 7.- Clayton, R.K. (1963) en "Bacterial Photosynthesis" (Gest, H., San Pietro, A. and Vernon, L.P. eds) pp. 377, Antioch Press, Yellow Spings, Ohio).
- 8.- Arnold, W. and Clayton, R.K., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 46 (1960), 769.
- 9.- Clayton, R.K., Photochem. Photobiol., 1 (1962), 305.
- 10.- Sistrom, W.R. and Clayton, R.K., Biochim. Biophys. Acta, 88 (1964) 61.
- 11.- Parson, W.W., Biochim. Biophys. Acta 153 (1968), 248.
- 12.- Reed, D.W. and Clayton, R.K., Biochem. Biophys. Res. Commun., 30 (1968), 471.
- 13.- Reed, D.W., J. Biol. Chem., 244 (1969), 4936.
- 14.- Clayton, R.K. and Wang, R.T., en "Methods in Enzymology" Vol XXIII (D.B.McCormick, L.D. Wright, eds.) pp. 696 New York, Academic Press 1971.
- 15.- Feher, G., Photochem, Photobiol., 14 (1971), 373.
- 16.- Reed, D.W. and Peters, G.A., J. Biol. Chem., 247 (1972), 7148.
- 17.- Okamura, M.Y., Steiner, L.A. and Feher, G., Biochemistry, 13 (1974), 1394.
- 18.- Sauer, K., (1974) en: "Bioenergetic of Photosynthesis" (Govindjee, ed), pp. 115, New York, Academic Press.

- 19.- Ke, B., Chaney, T.H. and Reed, D.W., Biochim. Biophys. Acta, 216 (1970), 373.
- 20.- Straley, S.C., Parson, W.W., Mauzerall, D. and Clayton, Biochim. Biophys. Acta, 305 (1973) 597.
- 21.- Prince, R.C., Codgell, R.J. and Crofts, A.R., Biochim. Biophys. Acta, 347 (1974), 1.
- 22.- Sauer, K., Dartz, E.A. and Coyne, L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 61 (1968), 17.
- 23.- Reed, D.W. and Ke, B.J. Biol. Chem., 248 (1973) 3041.
- 24.- Philipson, K.D. and Sauer, K., Biochemistry, 11 (1972) 1880.
- 25.- Philipson, K.D. and Sauer, K., Biochemistry, 12 (1973) 535.
- 26.- Olson, J.M. and Ke, B., (1974) Am. Soc. Photobiol. 2nd. Annu. Meet. Abstr. TAM-CII.
- 27.- Sauer, K., (1972) en "methods in Enzymology" Vol. XXIV (D.B. McCormick, L.D. Wright, eds.) pp. 206, Academic Press, New York.
- 28.- Brody, S.S. and Rabinowitch, E., Science, 125 (1957), 555.
- 29.- Fernández, J. and Becker, R.S., J. Chem. Phys., 31 (1959) 467.
- 30.- Commoner, B., Heise, J.J. and Townsend, J., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 42 (1966), 710.
- 31.- Norris, J.R., Uphaus, R.A., Crespi H.L. and Katz, J.J., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 68 (1971) 625.
- 32.- Katz, J.J. and Norris, J.R., Curr. Top. Bioenerg., 5 (1973), 41.
- 33.- McElroy, J.D., Feher, G. and Mauzerall, D.C., Biochim. Biophys. Acta, 267 (1972), 363.
- 34.- McElroy, J.D., Mauzerall, D.C. and Feher, G., Biochim. Biophys. Acta, 333 (1974), 261.
- 35.- Norris, J.R., Druyan, M.E. and Katz, J.J., J. Am. Chem. Soc., 95 (1973), 1680.

- 36.- Feher, G., Hoff, A.J., Isaacson, R.A. and McElroy, J.D., (1973), 17th. Annu. Meet. Biophys. Soc. Abstr. WPM-H7.
- 37.- Feher, G., Hoff, A.J., Isaacson, R.A. and Ackerson, L.C., Ann. N.Y. Acad. Sci., 244 (1975), 239.
- 38.- Ballschmitter, K. and Katz, J.J., J. Am. Chem. Soc., 91 (1969), 2661.
- 39.- Clayton, R.K., Brookhaven. Symp. Biol., 19 (1967), 97.
- 40.- Breton, J. and Roux, E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 45 (1971), 557.
- 41.- Morita, S. and Miyazaki, T., Biochim. Biophys. Acta, 245 (1971), 151.
- 42.- Geacintor, N.E., Van Nostrand, F., Pope, M. and Tinkel, J.B., Biochim. Biophys. Acta, 226 (1971), 486.
- 43.- Breton, J., Becker, J.F. and Geacintor, N.E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 54 (1973), 1403.
- 44.- Junge, W. and Eckhof, A., Biochim. Biophys. Acta, 357 (1974), 103.
- 45.- Vermeiglio, A. and Clayton, R.K.; Biochim. Biophys. Acta, 449 (1976), 500.
- 46.- Clayton, R.K. and Hasselkorn R., J. Mol. Biol., 68, (1972), 97.
- 47.- Clayton, R.K. and Clayton, B.J., Biochim. Biophys. Acta, 283 (1972), 492.
- 48.- Steiner, L.A., Okamura, M.Y., Lopes, A.D., Moskowitz, E. and Feher, G., Biochemistry, 13 (1974), 1403.
- 49.- Wraight, C.A. and Clayton, R.K., Biochim. Biophys. Acta, 333 (1974), 246.
- 50.- Slooten, L., Biochim. Biophys. Acta, 256 (1972), 452.
- 51.- Zankel, K.L., Reed, D.L. and Clayton, R.K., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 61 (1968), 1243.
- 52.- Netzel, T.L., Rentzepis, P.M. and Leigh, J.S., Science, 182 (1973), 238.
- 53.- Dutton, P.L., Leigh, J.S. and Reed, D.W., Biochim. Biophys. Acta, 292 (1973), 654.

- 54.- Wraight, C.A., Leigh, J.S., Dutton, P.L. and Clayton, R.K. Biochim. Biophys. Acta, 333 (1974), 401.
- 55.- Parson, W.W., Clayton, R.K. and Codgell, R.J., Biochim. Biophys. Acta, 387 (1975) 256.
- 56.- Leigh, J.S. and Dutton, P.L., Biochim. Biophys. Acta, 357 (1974), 67.
- 57.- Rockley, M.G., Windsor, M.M., Codgell, R.J. and Parson, W.W., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 72 (1975), 2251.
- 58.- Kaufmann, K.Y., Dutton, P.L., Netzel, T.L., Leigh, J.S. and Rentzepis, P.M., Science, 188 (1975), 3101.
- 59.- Krasnovsky A.A. and Voinovskaya, K.K., Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R., 81 (1951) 879.
- 60.- Clayton, R.K. and Straley, S.C., Biophys. J., 12 (1972), 1221.
- 61.- Shuvalov, V.A., Klimov, V.V., Krakhmaleva, I.N., Moskalenko, A.A. and Krasnovsky, A.A., Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R., 227 (1976), 984.
- 62.- Klimov, V.V., Shuvalov, V.A., Kralhmaleva, I.N., Karapetyan, N.V. and Krasnovsky, A.A., Biochimia, 41 (1976), 8.
- 63.- Shuvalov, V.A. and Klimov, V.V., Biochim, Biophys. Acta, 440 (1976), 587.
- 64.- Codgell, R.J., Monger, T.G. and Parson, W.W., Biochim. Biophys. Acta, 408 (1975), 189.
- 65.- Dutton, P.L., Kaufmann, K.Y., Chance, B. and Rentzepis, P.M., FEBS Lett., 60 (1975), 275.
- 66.- Shuvalov, V.A., Krakhmaleva, I.N. and Klimov, V.V., Biochim. Biophys. Acta, 449 (1976), 597.
- 67.- Uphaus, R.A., Norris, J.R. and Katz, J.J., Biochem Biophys. Res. Commun., 61 (1975), 1057.
- 68.- Reed, D.W., and Mayne, B.C., Biochim. Biophys. Acta, 226, (1971), 477.
- 69.- Parson, W.W., Biochim. Biophys. Acta, 189 (1969), 384.
- 70.- Clayton, R.K., Fleming, H. and Szuts, E.Z., Biophys. J., 12 (1972), 46.

- 71.- Dutton, P.L., Kihara, T., McGray, J.A. and Thornber, J.P. Biochim. Biophys. Acta, 226 (1971), 81.
- 72.- Dutton, P.L. and Jackson, J.B., Eur. J. Biochem. 30 (1972), 495.
- 73.- Jackson, J.B., Codgell, R.J. and Crofts, A.R., Biochim. Biophys. Acta, 292 (1973), 218.
- 74.- Codgell, R.J. and Crofts, A.R., FEBS Lett., 27 (1972), 176.
- 75.- Reed, D.W., Zankel, K.L. and Clayton, R.K., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 63 (1969), 42.
- 76.- Dutton, P.L., Leigh, J.S. and Wraight, C.A., FEBS Lett., 36 (1973), 169.
- 77.- Carithers, R.P. and Parson, W.W., Biochim. Biophys. Acta, 387 (1975), 194.
- 78.- Silberstein, B.R. and Grömet Elhanan, Z., FEBS Lett., 42 (1974), 141.
- 79.- Govindjee, R., Smith, Jr., W.R. and Govindjee, Photochem. Photobiol., 20 (1974), 191.
- 80.- Leigh, J.S. and Dutton, P.L., Biochem. Biophys. Res. Commun, 46 (1972), 414.
- 81.- Dutton, P.L. and Leigh, J.S. Biochim. Biophys. Acta, 314 (1973), 178.
- 82.- Feher, G., Isaacson, R.A., McElroy, J.D., Ackerson, L.C. and Okamura, M.Y. Biochim. Biophys. Acta, 368 (1974), 135.
- 83.- Bolton, J.R., Clayton, R.K. and Reed, D.W. Photochem. Photobiol., 9 (1969), 209.
- 84.- Feher, G., Okamura, M.Y. and McElroy, J.D., Biochim. Biophys. Acta, 267 (1972), 222.
- 85.- Loach, P.A. and Hall, R.L., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 69 (1972), 786.
- 86.- Bolton, J.R. and Cost., K., Photochem. Photobiol., 18 (1973), 417.
- 87.- Halsey, Y.D. and Parson, W.W., Biochim. Biophys. Acta, 347 (1974), 404.
- 88.- Feher, G., Okamura, M.Y. and McElroy, J.D. (1972) 16th. Annu. Meet. Biophys. Soc. Abstr. FPM-J17.

- 89.- Clayton, R.K. and Straley, S.C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 39 (1970), 1114.
- 90.- Bensasson, R. and Land, E.J., Biochim. Biophys. Acta, 325 (1973), 175.
- 91.- Slooten, L., Biochim. Biophys. Acta, 275 (1972), 208.
- 92.- Codgell, R.J., Wraight, C.A., Clayton, R.K. and Dutton, P.L. Fed. Proc., 33 (1974), 1577.
- 93.- Prince, R.C., Leigh, J.S. (Jr.) and Dutton, P.L., Biochim. Biophys. Acta, 440 (1976), 622.
- 94.- Tiede, D.M., Prince, R.C. and Dutton, P.L., Biochim. Biophys. Acta, 449 (1976), 447.
- 95.- Prince, R.C. and Dutton, P.L. Arch. Biochem. Biophys. 172 (1976), 329.
- 96.- Fajer, J., Brune, D.C., Davis, M.S., Forman, A. and Spaulding, L.D., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 72 (1975), 4956.
- 97.- Drews, G., Lampe, H.H. and Ladwig, R., Arch. Microbiol. 65 (1969), 12.
- 98.- Oelse, J. and Drews, G., Biochim. Biophys. Acta, 265 (1972), 209.
- 99.- Thornber, J.P., Olson, J.M., Williams, D.M., Clayton, M.J. Biochim. Biophys. Acta, 172 (1969), 351.
- 100.- Dixon, M. and Webb, E.C., "Enzymes", Second Edition, pp 43, (1964).
- 101.- Loach, P.A., Hadsell, R.M., Sekura, D.L. and Stemer, A., Biochemistry, 8 (1970), 3127.
- 102.- Loach, P.A., Sekura, D.L. Hadsell, R.M. and Stemer, A., Biochemistry, 9 (1970), 724.
- 103.- King, T.P., Biochemistry, 11 (1972), 367.
- 104.- Weber, K., Osborn, M., J. Biol. Chem., 244 (1969), 4406.
- 105.- Bonnichsen, R., en "Methods in Enzymology", Vol. II (S.P. Colowick and N.O. Kaplan, eds.), pp 781, New York. Academic Press. (1964).
- 106.- Blight, E.G. and Dyer, W.J., Canad. J. Biochem. Physiol., 37 (1959), 911.

- 107.- Nichols, B.W., en "New biochemical separations" (A.T.James and L.J. Morris, eds.) pp. 321. London, Van Nostrand, 1964.
- 108.- Vaskowsky, V.E., Kotsketsky, E.V., J. Lipid Res., 9 (1968), 396.
- 109.- Bregoff, H.M., Roberts, E. and Delwiche, C.C., J. Biol. Chem. 205 (1953), 565.
- 110.- Chinard, F.P., J. Biol. Chem., 199 (1952), 91.
- 111.- Barlett, G.R., J. Biol. Chem., 234 (1959), 466.
- 112.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.H., Farr, A.L. and Randall, R.J., J. Biol. Chem., 193 (1951), 265.
- 113.- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W.R. and Stanier, R.Y., J. Cell. Comp. Physiol., 49 (1957), 25.
- 114.- Cohen-Bazire, G. and Kunisawa, R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 46 (1960), 1543.
- 115.- Drews, G. and Giesbrecht, P., Zbl, Bakt., I. Abt. Orig. 190 (1963), 508.
- 116.- Holt, S.C. and Marr, A.G., J. Bacteriol., 89 (1965), 1513.
- 117.- Giesbrecht, P. and Drews, G., Arch. Microbiol., 43 (1962), 152.
- 118.- Tauschel, H.D. and Drews, G., Arch. Microbiol., 59 (1967), 381.
- 119.- Schröder, J. and Drews, G., Arch. Microbiol., 64 (1968), 59.
- 120.- Schröder, J., Biedermann, M. and Drews, G., Arch. Microbiol. 66 (1969), 273.
- 121.- Dunker, A.K. and Rueckert, R.R., J. Biol. Chem., 244 (1969), 5070.
- 122.- Nieth, K.F., Drews, G. and Feick, R., Arch. Microbiol., 105 (1975), 43.
- 123.- Noël, H., Vander Rest, M. and Gingras, G., Biochim. Biophys. Acta, 275 (1972), 219.
- 124.- García, A.F., Vernon, L.P., Ke, B. and Mollenhauer, H.H., Biochemistry, 7 (1968), 326.

- 125.- Dunphy, P.J. and Brodie, A.F., En "Methods in enzymology" Vol. XVIII (D.B.McCormick, L.D. Wright, eds.) pp. 407 New York, Academic Press 1971.
- 126.- Gula, E.A., Butler, T.F., King, R.D. and Smith, G.L., Can. J. Microbiol., 13 (1967), 1499
- 127.- Rottem, S., Stein, O. and Razin, R., Arch. Biochem. Biophys. 125 (1968), 46.
- 128.- Racker, E. and Proctor, H., Biochem. Biophys. Res. Commun, 39 (1970), 1120.
- 129.- Abrams, H. and Baron, C., Biochemistry, 7 (1968), 501
- 130.- Niederman, R.A. and Gibson, K.D., Prep. Biochem, 1 (1971), 141.
- 131.- Kerber, N.L., Pucheu, N.L. and García, A.F., Acta Fisiol. Lat., (1976), en Prensa.
- 132.- Rivas, E.A., Kerber, N.L., Viale, A.A. and García, A.F., FEBS Lett., 10 (1970), 37
- 133.- Thornber, J.P., Biochemistry, 9 (1970), 2688.
- 134.- Branton, D. and Park, R.B., J. Ultrastruct, Res., 19 (1967), 283.
- 135.- Reed, D.W., Raveed, D. and Israel, H.W., Biochim. Biophys. Acta, 223 (1970), 281.
- 136.- Singer S.J. and Nicolson, G.L., Science, 175 (1972), 720.
- 137.- Clayton, R.K., Biochim, Biophys. Acta, 75 (1963), 312.
- 138.- Gingras, G. and Jolchine, G., Prog. Photosynthesis Res., 1 (1969), 209.
- 139.- García, A.F., Vernon, L.P. and Mollenhauer, H., Biochemistry, 5 (1966), 2399.
- 140.- Clayton, R.K. and Yau, H.F., Biophys. J., 12 (1972), 867.
- 141.- Feher, G., Okamura, M.Y., Raymond, J.A. and Steiner, L.A. Biophys. Soc. Abstr. New Orleans, 11, 38a.
- 142.- Wang, R.T. and Clayton, R.K., Photochem. Photobiol., 17 (1973), 57.
- 243.- Segen, B.J. and Gibson, K. D., J. Bacteriol., 105 (1971), 701.

- 144.- Smith, W.R. (Jr.), Sybesma, C. and Dus, K., Biochim. Biophys. Acta, 267 (1972), 609.
- 145.- Fraker, P.J. and Kaplan, S., J. Bacteriol., 108 (1971), 465.
- 146.- Fraker, P.J. and Kaplan, S., J. Biol. Chem., 247 (1972), 2732.
- 147.- Jolchine, G. and Reiss-Husson, F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 48 (1972), 333.
- 148.- Reiss-Husson, F. and Jolchine, G., Biochim. Biophys. Acta 256 (1972), 440.
- 149.- Thornber, J.P. and Olson, J.M., Photochem. Photobiol., 14 (1971), 329.-