

## SEPARACIÓN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN 2-D DE MEMBRANAS TILACOIDALES

Sofía Andaluz, Javier Abadía, Anunciación Abadía

Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apartado 202, 50080 Zaragoza.

**Introducción**

La deficiencia en hierro disminuye marcadamente la tasa de fotosíntesis. Las hojas deficientes en hierro reducen el número de membranas tilacoidales por cloroplasto (Spiller y Terry 1980) y los componentes de las membranas: transportadores electrónicos de la cadena fotosintética (Spiller y Terry 1980), clorofilas y carotenoides (Abadía y Abadía 1993, Morales et al., 1990). Una de las principales características de las hojas deficientes en hierro es la clorosis debida a la baja concentración de clorofilas y carotenoides por área (Morales et al. 1990, 1994; Abadía y Abadía 1993). No todos los pigmentos disminuyen en igual cantidad, ya que existe una pérdida preferente de Chl *b* y por lo tanto de antena extrínseca LHC. Además Riethman y Sherman 1988 y Burnap et al 1993 publicaron la existencia de un nuevo pigmento-proteína inducido por la deficiencia de hierro en cianobacteria. Todo parece indicar que el patrón polipeptídico de las membranas de hojas deficientes en hierro podría ser distinto al de las membranas de las hojas control. Aunque en nuestro grupo de investigación ya se habían efectuado trabajos sobre electroforesis en 2 D (González-Vallejo, 1999), se han aprovechado los nuevos avances de la proteómica para llevar a cabo esta nueva aproximación.

**Materiales y métodos.**

1.- Cultivo hidropónico de remolacha.

El cultivo de remolacha (*Beta vulgaris* híbrido L. Monohil de Hilleshög, Landskröna, Suecia) se realiza en cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16 h de luz/ 8 h de oscuridad, 25° de temperatura, 80 % de humedad y una intensidad de 350  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Las semillas germinan y crecen en vermiculita durante 2 semanas. Se pasan a bandejas de cultivo (40 plántulas/35 L) donde crecen durante dos semanas más en solución nutritiva 1/2 de Hoagland con 45  $\mu\text{M}$  Fe(III)-EDTA y después se transplantan a cubos (4 plantas/20 L) con solución nutritiva 1/2 de Hoagland con 0 o 45  $\mu\text{M}$  Fe(III)-EDTA. El pH de la solución nutritiva sin hierro es de 7,7 ya que se añade a la solución nutritiva NaOH 1 mM y CaCO<sub>3</sub> 1g L<sup>-1</sup>. El pH de la solución nutritiva con hierro se ajusta a 5,5. Transcurridos 10 días en los cubos, se escinden las hojas para realizar los experimentos.

2.- Aislamiento de tilacoides y PSII<sub>m</sub>

El método utilizado para el aislamiento fue el desarrollado por Berthold et al., (1981) con las modificaciones introducidas por Dunahay et al. (1984). Las hojas de remolacha se escinden media hora después de encenderse la luz de la cámara de cultivo. Posteriormente, se pesan y trocean en tiras finas excluyendo el nervio principal a 4° C y bajo luz tenue. Se debe evitar la desecación del material. Las hojas troceadas se trituran en una batidora Osterizer añadiendo previamente a la homogeneización solución B1 (NaCl 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, tricina 20 mM, BSA 0,2%, pH 8) a razón de 2 ml/g. El puré obtenido se filtra a través de dos capas de Miracloth. El filtrado se centrifuga a 300 g en centrifuga Beckman Avanti<sup>TM</sup> J-20XP rotor JLA 10.500 durante 2 min y se recoge el sobrenadante. Éste se centrifuga a 10.000 g en rotor JLA 10.500 durante 10 min. El pellet, compuesto en su mayoría por cloroplastos, se resuspende con un pincel en un pequeño volumen de tampón B2 (NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, tricina 20 mM, BSA 0,2%, pH 8). Se adicionan 25 ml de medio B2 y se centrifuga a 9.000 g en rotor JA 25.50 durante 10 min. El pellet, formado por tilacoides, se resuspende y se homogeniza en un homogeneizador de vidrio con varilla de teflón con un pequeño volumen de medio B3 (NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MES 50 mM, pH 6). Se toma una alícuota y tras centrifugar para sedimentar el material precipitado, se mide la concentración de Chl en acetona al 80 % aplicando las fórmulas de Arnon. Para el aislamiento de PSII<sub>m</sub> de plantas control se ajusta a una concentración de 3 mg Chl ml<sup>-1</sup> con tampón B3 y se añade sobre la muestra Triton X-100 al 20 % (p/v) en medio B3 en una relación Triton X-100/Chl de 25/1. Para el aislamiento de PSII<sub>m</sub> de plantas cloróticas en lugar de utilizar la misma relación Triton X-100/Chl que en plantas control, se utiliza la misma relación Triton X-100/proteína de 3,1/1. El detergente se añade gota a gota y con agitación. La muestra se mantiene en baño de hielo y agitación durante 25 min

a 4° C y en oscuridad. Tras la solubilización, la muestra se centrifuga a 4.500 g en rotor JA 25.50 durante 5 min. El sobrenadante se ultracentrifuga a 40.000 g en un aparato Beckman Optima™ XL-100K (23.000 rpm en un rotor de ángulo fijo 70 Ti) durante 30 min. El pellet obtenido en esta centrifugación es la fracción PSII<sub>m</sub>. El pellet se resuspende en un pequeño volumen de tampón B4 (NaCl 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MES 50 mM, sacarosa 400 mM, pH 6) y se mide la Chl en acetona del 80 %. Tanto las preparaciones de tilacoides como las de PSII<sub>m</sub> se almacenan en alícuotas a 77K hasta su posterior utilización.

### 3.- Electroforesis en 2-Dimensiones.

-Preparación de la muestra

#### Extracción de proteína.

1) con acetona. Se toma aproximadamente 1 mg de proteína de tilacoides o PSII<sub>m</sub> y se resuspende en acetona al 80% y mercaptoetanol al 0,07%. Se precipita durante al menos 30 min a -20°C y después se centrifuga a 10.000 g durante 10 min en centrifuga Beckman Avanti™ J-20XP rotor JA 25-50. Se elimina inmediatamente el sobrenadante, se lava el precipitado en acetona al 80% y mercaptoetanol al 0,07% y se repite el proceso de precipitación y centrifugación en las condiciones anteriores. Se elimina de nuevo el sobrenadante y se seca el precipitado con N<sub>2</sub>.

2) con fenol. Modificando el método de Hurkman et al., (1986) se toman 200 µg de proteína de tilacoides o PSII<sub>m</sub>, se resuspende en tampón de suspensión (Tris 0,5M, HCl 30 mM, sacarosa 0,7 M, EDTA 50 mM, KCl 0,1 M, mercaptoetanol 2% (v/v) y PMSF 2 mM). Se incuba a 4°C durante 10 min agitando esporádicamente y se añade 200 µL de fenol saturado en tampón Tris-HCl pH 8. Se somete a agitación fuerte durante 10 min a temperatura ambiente y después se centrifuga a 5.000 g durante 10 min en centrifuga Beckman Avanti™ J-20XP rotor JA 25-50 para separar las dos fases. Para precipitar la proteína se incuba durante al menos 12 h a -20°C en 5 volúmenes de NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO 1 M en metanol. Después se centrifuga a 20.000 g en rotor JA 25-50 durante 10 min y se realizan tres lavados con NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO 1 M en metanol. Finalmente se añade 1 mL de acetona fría para precipitar la proteína, se centrifuga a 20.000 g en rotor JA 25-50 durante 10 min y se seca el precipitado con N<sub>2</sub>.

#### Solubilización de proteínas.

Se han utilizado 4 medios para la solubilización de la proteína precipitada: 1) tampón de solubilización/rehidratación de Bio-Rad: urea 8 M, CHAPS 2%, DTT 50 mM, anfólitos Bio-Lyte® 3/10 0,2% (p/v) y trazas de azul de bromofenol; 2) tampón de extracción 3 de BioRad: urea 5 M, thiourea 2 M, CHAPS 2%, Tris 40 mM, anfólitos 0,2% (p/v); 3) tampón de carga: urea 9,5 M, CHAPS 3,5%, NP-40 1%, PMSF 2 mM, mercaptoetanol 2% (v/v) y anfólitos 5%; y 4) extracción sucesiva con 75 µL de urea 9,5 M, SDS 1%, mercaptoetanol 10%, 25 µL de CHAPS 10% y anfólitos 9% y 100 µL de CHAPS 2%, anfólitos 2% y urea 9,5 M.

Para cuantificar la cantidad de proteína obtenida se utiliza el RC DC Protein Assay de BioRad basado en el método de Lowry et al., (1951).

-Primera dimensión: IEF (isoelectroenfoque).

El IEF se realiza en tiras Bio-Rad ReadyStrip, pH 4-7 de 7 cm. Primero se efectúa la rehidratación de las tiras con 125 µl de muestra en el tampón de solubilización/rehidratación durante toda la noche y a continuación se realiza el isoelectroenfoque usando la fuente Bio-Rad PROTEAN IEF durante 5 h a 14.000 V-h. Antes de correr la segunda dimensión es necesario equilibrar las tiras en dos incubaciones sucesivas de 10 min con los tampones de Bio-Rad SDS-PAGE Equilibration Buffer I y II, que contienen urea 6 M, Tris 0,375 M pH 8,8, SDS 2 %, glicerol 20 % y DTT 2 % en el Buffer I y yodoacetamida 2,5 % en el Buffer II.

-Segunda dimensión: electroforesis SDS-PAGE.

La segunda dimensión se realiza según Laemli (1970) en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) del 12,5%, de dimensiones 10 x 8 cm y un grosor de 1 mm, en una fuente Hoefer SE-250, durante 1 h a 40 mA de corriente constante. Posteriormente se realiza el tinte de los geles con azul Coomassie durante toda la noche, y a continuación se lava hasta que el fondo del gel pierde el color.

### Resultados.

Se han utilizado distintos métodos para la precipitación y la solubilización de las muestras: precipitación con acetona y fenol, y solubilización con tampón de solubilización/rehidratación de BioRad (urea 8 M, CHAPS 2%, DTT 50 mM, anfólitos Bio-Lyte® 3/10 0,2% (p/v) y trazas de azul de bromofenol); tampón de extracción 3 de BioRad (urea 5 M, thiourea 2 M, CHAPS 2%, Tris 40 mM, anfólitos 0,2% (p/v)); tampón de carga (urea 9,5 M, CHAPS 3,5%, NP-40 1%, PMSF 2 mM, mercaptoetanol 2% (v/v) y anfólitos 5%); y solubilización sucesiva con 75 µL de urea 9,5 M, SDS 1%, mercaptoetanol 10%, 25 µL

de CHAPS 10% y anfólitos 9% y 100 µl de CHAPS 2%, anfólitos 2% y urea 9,5 M. Los mejores resultados se han obtenido precipitando la muestra con acetona y solubilizándola con tampón de solubilización/rehidratación. A continuación se muestran las imágenes correspondientes a los análisis mediante electroforesis en 2-Dimensiones de muestras de tilacoides control y deficiente en hierro preparadas en las condiciones antes indicadas. Como se ve en las imágenes la deficiencia en hierro afecta a la composición proteica de las membranas de los tilacoides

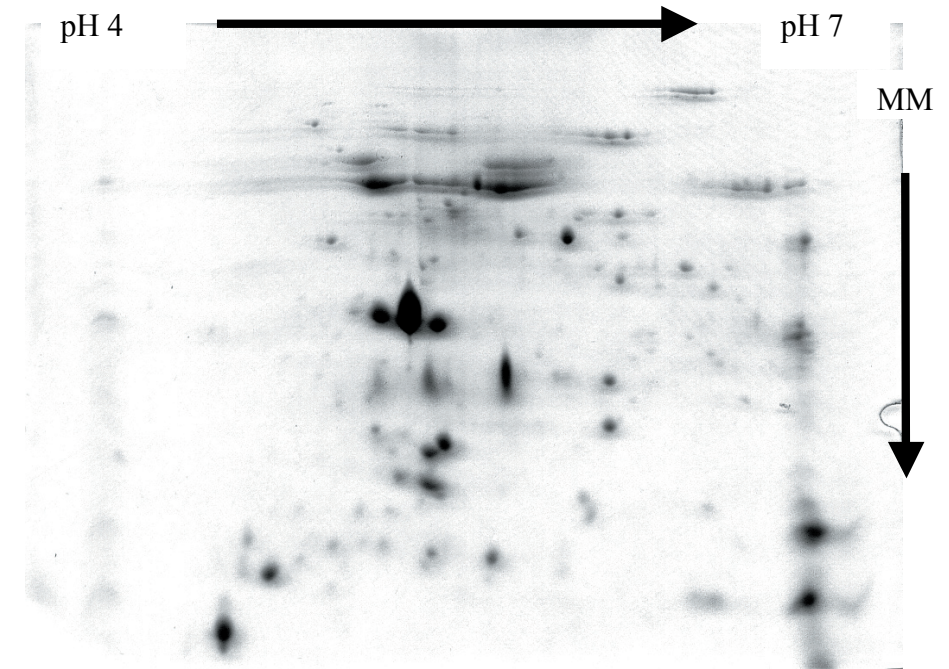


Figura 1.- Electroforesis en 2-Dimensiones de proteínas de tilacoides control.

### Agradecimientos

Financiado por los proyectos del Plan Nacional de Investigación AGL2000-1721 a AA, y PB97-1176 y BOS2001-2343 a JA.

### Bibliografía

- Abadía J and Abadía A (1993) Iron and Plant Pigments. In: Barton LL and Hemmig BC (eds) Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms, pp 327-344. Academic Press, San Diego, CA.
- Berthold DA, Babcock GT and Yocum CA (1981) Highly resolved oxygen-evolving Photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. FEBS Lett: 231-234.
- Burnap RL, Troyan T and Sherman LA (1993) The highly abundant chlorophyll-protein complex of iron-deficient *Synechococcus* sp. PCC7942 (CP43') is encoded by the *isiA* gene. Plant Physiol 103: 893-902.
- Dunahay TG, Staehelin LA, Seibert M, Ogilvie PD and Berg SP (1984) Structural, biochemical and biophysical characterization of foru oxygen-evolving Photosystem II preparations from spinach. Biochim. Biophys Acta 764: 179-193.
- González Vallejo E. Caracterización de mecanismos de adquisición de Fe en plantas superiores. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, España.
- Hurkman WJ and Tanaka KT (1986) Solubilization of planta membrane proteins for analysis by two-Dimensional gel electrophoresis. Plant Physiol 81: 802-806.

Laemli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 533-540.

Lowry OH, Rosebrough NG, Lewis-Farr A and Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

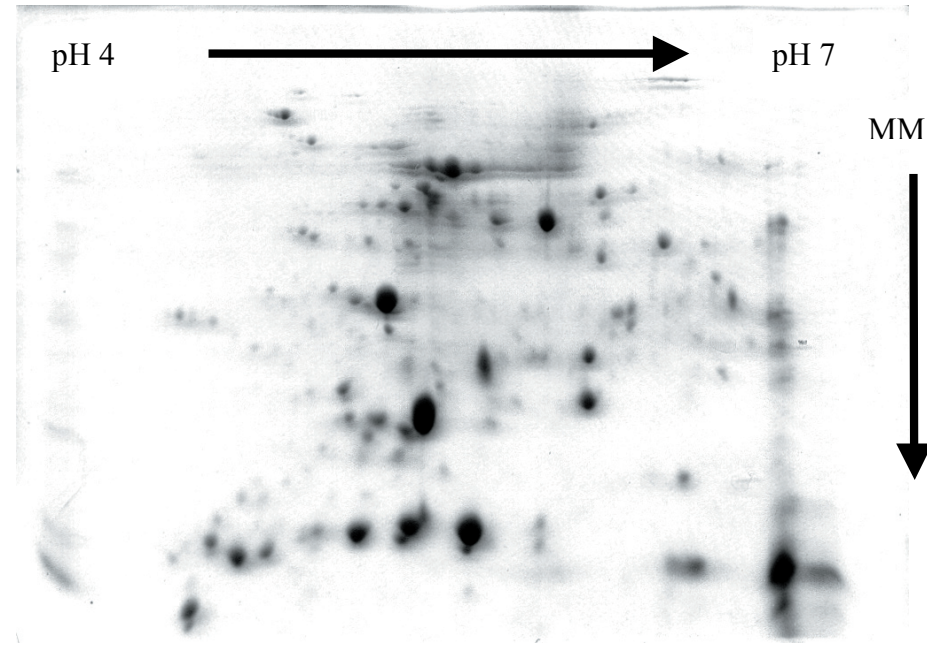


Figura 1.- Electroforesis en 2-Dimensiones de proteínas de tilacoides deficientes en Fe

Morales F, Abadía A and Abadía J (1990) Characterization of the xanthophyll cycle and other photosynthetic pigment changes induced by iron deficiency in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 94: 607-613.

Morales F, Abadía A, Belkhdja R and Abadía J (1994) Iron deficiency-induced changes in the photosynthetic pigment composition of field-grown pear (*Pyrus communis* L.) leaves. *Plant Cell Environ* 17: 1153-1160.

Riethman HC and Sherman LA (1988) Purification and characterization of an iron stress-induced chlorophyll-protein from the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2. *Biochim Biophys Acta* 935: 141-151.

Spiller S and Terry N (1980) Limiting factors in photosynthesis. II. Iron stress diminishes photochemical capacity by reducing the number of photosynthetic units. *Plant Physiol* 65:121-125.

## A NEW MODEL, DERIVED FROM FLUORESCENCE INDUCTION OF PHOTOSYSTEM II MEMBRANES, RATIONALIZES STEPS TILL REDUCTION AND PROTONATION OF THE QUINONE POOL

Pedro Heredia, Mónica Balsera, Juan B. Arellano and Javier De Las Rivas

Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología (IRNA, CSIC). P.O. Box 257. 37071 Salamanca. Spain.  
Tf: 34 923 21 96 06. E-mail: jrivas@usal.es

### Introduction

It is well known that the main essential macronutrients that all plants need to survive are the ones that primarily feed the photosynthetic process: H<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub>. These compounds are the main chemical fuels that allow the daily running of our green planet. Photosystem II (PSII) is a membrane-bound pigment-protein complex that constitutes an essential part of the molecular machinery that carries out photosynthesis in plants. PSII is able to reduce plastoquinone using water as substrate, i. e. as primary electron donor of the light-dependent sequential reactions till the formation of plastoquinol (Rutherford 1989).

Chlorophylls (Chl) are the main photosynthetic pigments of green plants and when absorb actinic light they can transfer it to the center of the photosystems to initiate the redox reactions (i. e. the photochemical activity) or they can dissipate this energy by producing fluorescence (i. e. light dissipation, non-photochemical activity). In this way when fluorescence appears it indicates the stop of electron transfer or other photochemical steps. In all dark-adapted oxygen-evolving photosynthetic organisms, the intensity of Chl fluorescence emission after illumination shows a characteristic variation in time known as fluorescence transient or *fluorescence induction* (FI) (Kautsky *et al* 1931). The Chl FI curve consists of a fast rise from F<sub>0</sub> to F<sub>P</sub>, minimal and maximal fluorescence intensity respectively, that behaves in inverse relation to the photochemical activity of PSII at room temperature (Krause *et al* 1991).

Two intermediate phases, the so-called J and I, have been identified between F<sub>0</sub> (O) and F<sub>P</sub> (P) in thylakoids membranes, intact chloroplasts and leaves (Strasser *et al* 1991, Srivastava *et al* 1995 and Strasser *et al* 1995), but not in PSII-enriched membranes where only the intermediate J phase is present (Pospisil *et al* 2000). In the Chl FI curve, the photochemical phase (J) is thought to correspond to the photoaccumulation of Q<sub>A</sub><sup>-</sup>; and the thermal phases (I and P) to the photoaccumulation of Q<sub>A</sub><sup>-</sup>/Q<sub>B</sub><sup>-</sup> and Q<sub>A</sub><sup>-</sup>/Q<sub>B</sub><sup>-</sup>, respectively (Strasser *et al* 1991 and Srivastava *et al* 1995). All these phases are light intensity dependent (Srivastava *et al* 1995) and also sensitive to electron transfer inhibitors or oxidized quinones. As manifested in a recent review (Lazar *et al* 1999), a full understanding of the Chl FI is not yet known and there is a great need for models able to meet unambiguously the molecular events occurring during the Chl FI. We have examined the slow components of the Chl FI curve in PSII-enriched membranes using oxidized and reduced/protonated quinones. Based on our results we propose a new model that rationalizes the FI observed in PSII-enriched membranes and reflects the intrinsic steps that occur in active PSII till the reduction and protonation of the plastoquinone pool.

### Materials and Methods

PSII-enriched membranes were isolated from market spinach (*Spinacia oleracea*) as in (Berthold *et al* 1981). PSII-enriched membranes had an activity of about 600-650 μmol of O<sub>2</sub> (mg of Chl)<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> in the presence of 250 μM 2,6-dichloro-*p*-benzoquinone (DCBQ) and 3.5 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. The Chl FI was measured at 20 °C with a transient recorder from Hansatech (TR1). The intensity used was 80 μE m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, strong enough to photoaccumulate but not to inhibit the Chl FI phases. Chl fluorescence signals were detected using a PIN-photodiode with a response peak at 860 nm. A cut off filter for wavelengths below 705nm (FDP/2 Hansatech) was included. Chl FI signals from 100 μs to 6 s were recorded on a PC and plotted in logarithmic time scales. DCMU (from SIGMA), 1,4-benzenediol (HQ) and 2,6-dicloro benzoquinone (DCBQ) (from ACROS-Organics) and 1,4-benzenedione (PBQ) (from MERCK-Schuchardt) were used. Quinones and DCMU were added to PSII-enriched membranes in the dark before illumination. All the FI signals were measured in dark adapted samples.

### Results

Chl FI curves in PSII-enriched membranes with no-additions and 50 μM DCMU are shown in Figure 1. The data are presented in a logarithmic time scale to better differentiate the steps. Several phases are observed in both Chl FI curves. The Chl FI control curve (in black) reveals three exponential components