

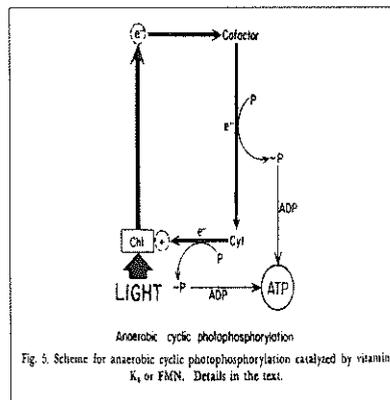
# EL CENTRO DE REACCIÓN FOTOSINTÉTICO: UN SISTEMA BIOLÓGICO CONVERTIDOR DE ENERGÍA LUMÍNICA EN ENERGÍA QUÍMICA

por el prof. Dr. D. JOSÉ MARÍA ORTEGA RODRÍGUEZ,  
Profesor Titular del "Instituto de Bioquímica  
Vegetal y Fotosíntesis" (Universidad de Sevilla  
y Consejo Superior de Investigaciones Científicas)  
y Premio "Real Maestranza de Caballería de Sevilla de 1996"

Conferencia pronunciada en la Academia  
el día 17 de febrero de 1998

## INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es el conjunto de reacciones físicas y químicas mediante las cuales las plantas y otros organismos fotosintéticos captan la energía luminosa proveniente del Sol y la transforman en energía química utilizable en todos sus procesos vitales. Los pasos iniciales de la fotosíntesis se desarrollan en unos complejos proteicos de membrana denominados centros de reacción fotosintéticos y consisten en la absorción de luz por pigmentos especiales tipo clorofila y en la posterior transferencia de electrones entre diferentes cofactores del complejo.



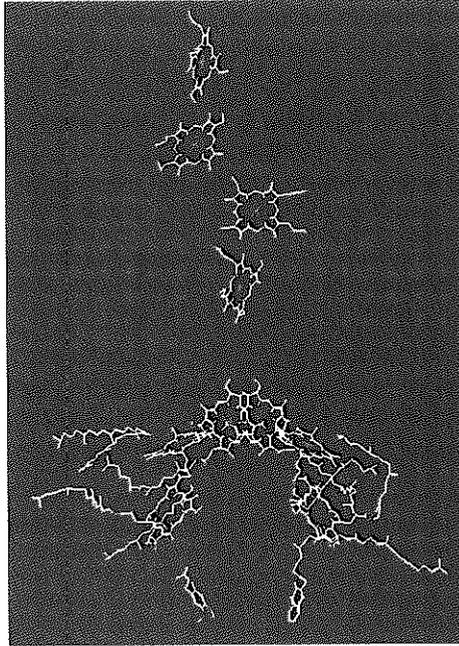
Las reacciones de transferencia de electrones no comenzaron a considerarse procesos fundamentales en biología hasta la década de los años 60. En esa época, Mitchel en su famosa Teoría Quimiosmótica (Mitchell, 1961) propuso un modelo mediante el cual la transferencia de electrones estaría asociada a los procesos de conversión de energía en los sistemas biológicos. En 1961 Arnon y Losada formularon la reacción básica de la fotosíntesis, en la que por primera vez se establecía que la luz induce un transporte de electrones en este proceso (Arnon, 1961; Losada et al. 1961; ver figura adjunta).

La teoría de Marcus ha establecido un modelo teórico cuantitativo para la comprensión de los parámetros que determinan la velocidad de las reacciones de transferencia de electrones en los sistemas químicos y biológicos (Marcus, R. A. y Suttin N. (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 811, 265-322). Los parámetros variables son básicamente cuatro: distancia, diferencia de energía libre entre los estados inicial y final ( $-\Delta G$ ), energía de reorganización ( $\lambda$ ) y temperatura. Gran parte de la investigación actual en este campo se centra en dos aspectos: (1) determinar si el modelo de Marcus es adecuado a los sistemas biológicos; (2) comprender cómo controla físicamente una proteína redox los parámetros  $-\Delta G$ ,  $\lambda$  y distancia en función de la constante de velocidad que requiera la reacción.

Las bacterias fotosintéticas anoxigénicas constituyen un importante grupo de procariontes fototróficos que, a diferencia de plantas, algas y cianobacterias, no utilizan el agua como donador último de electrones sino compuestos reducidos de azufre o compuestos orgánicos. Los centros de reacción de estos organismos se están utilizando como sistemas modelos ideales para avanzar en la comprensión de los mecanismos que gobiernan las reacciones de transferencia electrónica, ya que ofrecen las siguientes ventajas: i) se conoce a nivel atómico la estructura del centro de reacción en dos especies de bacterias purpúreas: *Rhodospseudomonas (Rps.) viridis* y *Rhodobacter sphaeroides*; ii) presentan al menos ocho reacciones redox diferentes que ocurren en una amplia gama de distancias (3 a 24 Å) y que poseen constantes de velocidad que van desde los picosegundos a los segundos y  $-\Delta G$  de 1 a 30 kcal/mol; muchas de ellas ocurren además en un amplio intervalo de temperaturas (300-4 K); iii) mediante mutagénesis dirigida es posible modificar sus propiedades; iv) las citadas reacciones pueden estudiarse con extrema precisión mediante espectroscopía cinética utilizando láseres pulsados para iniciar la reacción.

Los científicos alemanes Michel, Deisenhofer y Huber recibieron en 1988 el premio Nobel de Química por la resolución de la estructura del centro de reacción de *Rps. viridis* en virtud del inmenso avance que esto supuso para el conocimiento de los mecanismos de conversión de la energía de la luz en energía química (Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R. y Michel H. (1985) *Nature* 318, 618-624). El centro de reacción de *Rps. viridis* está compuesto de tres polipéptidos llamados L, M y H, una cuarta subunidad C, que es un citocromo de cuatro hemos fuertemente asociado al complejo, y catorce cofactores redox (ver figura adjunta): cuatro hemos, cuatro bacterioclorofilas *b*, dos bacteriofeofitinas *b*, dos quinonas, un carotenoide y un hierro no hemínico).

Los cuatro hemos están covalentemente ligados a la subunidad C, mientras que el resto se asocia no covalentemente a las subunidades L y M. El citocromo es una



lipoproteína y está anclada en la membrana mediante su parte lipídica, un diglicérido con 18 átomos de carbono en cada cadena asociado al citocromo a través de un enlace tioéster entre la cisteína N-terminal y el tercer hidroxilo del glicerol. El complejo posee 11  $\alpha$ -hélices que atraviesan la membrana, 5 en L, 5 en M y 1 en H. La mayor parte de las subunidades L y M, así como sus cofactores, presentan un eje de simetría rotacional doble perpendicular al plano de la membrana (Deisenhofer et al. 1995). Tan sólo una de las dos ramas de cofactores es fotoquímicamente activa.

La luz es absorbida por los complejos antena que rodean al centro de reacción y es transferida en forma de energía de excitación al dímero de bacterioclorofila, denominado par especial (P), que pasa a un estado excitado. Este estado cae a su estado basal transfiriendo un electrón vía la bacterioclorofila accesoria y la bacteriofeofitina hasta el aceptor primario, la quinona  $Q_A$  (una menaquinona-9). P en su estado oxidado ( $P^+$ ) es reducido entonces por el citocromo *c*. Finalmente  $Q_A$  cede su electrón a  $Q_B$  (una ubiquinona-9). Después de un segundo acto fotoquímico como el descrito, un segundo electrón llega a  $Q_B$  que toma dos protones del medio externo. El ubiquinol  $Q_BH_2$  abandona el centro de reacción y dona sus dos electrones al complejo  $bc_1$ , proceso concomitante con la translocación de protones a través de la membrana responsable de la generación de un gradiente electroquímico que será utilizado por las ATP sintetasas para sintetizar ATP.

En la exposición se resumirán los principales resultados que hemos obtenidos en el estudio de varios de los procesos de transferencia de electrones que ocurren en los centros de reacción de bacterias purpúreas. Especial atención se dedicará a la reacción

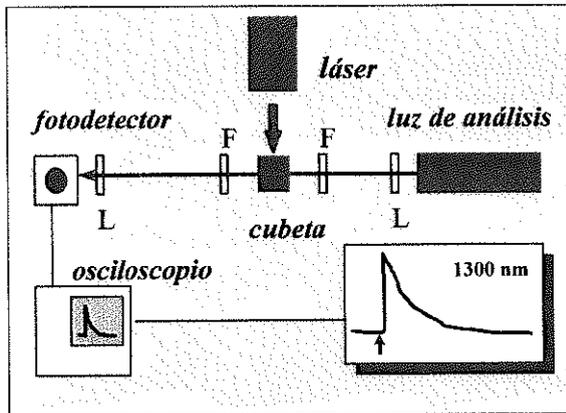
redox entre el citocromo *c* tetrahémico y el par especial de bacterioclorofilas en *Rps. viridis*. En 1966 DeVault y Chance estudiando la fotooxidación de un citocromo *c* parecido en *Chromatium vinosum*, otra bacteria purpúrea, describieron el primer caso de reacción biológica cuya tasa no dependía de la temperatura; el llamado Túnel Cuántico. Estos experimentos han sido fundamentales en la elaboración de las teorías de la transferencia biológica de electrones. Nosotros hemos investigado en profundidad la misma reacción en una especie, como *Rps. viridis*, cuya estructura tridimensional se conoce a nivel atómico. En concreto se expondrán los resultados obtenidos en relación a cuatro aspectos: i) ¿Por qué la mayor parte de las bacterias fotosintéticas utilizan citocromos multihémicos?; ii) ¿cuál es el efecto de la temperatura en la velocidad y en rendimiento de la reacción?; iii) ¿hay aminoácidos específicos que afecten a la reacción?; iv) ¿cuál es la funcionalidad de las moléculas de agua que aparecen estructuralmente asociadas entre ambos centros redox? Experimentos de mutagénesis dirigida en los que se ha alterado el potencial de óxido-reducción del par especial de bacterioclorofila en *Rhodobacter sphaeroides* han permitido investigar la adecuación de la teoría de Marcus para describir una de las reacciones de transferencia electrónica de este sistema.

## **METODOLOGÍA**

La transferencia de electrones entre el citocromo tetrahémico y el par especial de bacterioclorofila (P) se ha estudiado observando los cambios en el estado de óxido-reducción de los hemos y de P tras la incidencia de un fotón de luz. Los cambios rápidos en el estado de óxido-reducción se pueden detectar mediante la técnica denominada espectroscopía cinética de excitación mediante láser observando los cambios en los espectros de absorción característicos de los cofactores. Así, los hemos del citocromo en su estado reducido poseen una banda de absorción llamada  $\alpha$  con máximos entre 550 y 560 nm, que en estado oxidado desaparece. Por otra parte, P posee en su estado oxidado (P<sup>+</sup>) una banda con un pico de absorción a 1300 nm que no existe en su estado basal (P).

El Dr. Paul Mathis (Sección de Bioenergética, CEA de Saclay, Francia) y yo mismo hemos diseñado y construido dos sistemas espectroscópicos con el objetivo de poder medir con suficiente resolución temporal los cambios de absorción en ambas zonas del espectro (Ortega y Mathis 1992; 1993; ver figura adjunta). El fundamento de ambos sistemas es el mismo: se hace pasar por la muestra un haz de la luz que absorbe el cofactor que vamos a estudiar (un haz láser de 1283 nm para P; luz blanca filtrada mediante filtros ópticos de banda estrecha con  $\lambda$  coincidentes con el máximo de absorción del hemo a estudiar). Un sistema de fotodetección rápido (un diodo de germanio para P; un fotomultiplicador para los hemos) recibirá la luz no absorbida por la muestra. Mediante un láser se inicia la reacción, siendo detectados los cambios de absorción con suficiente resolución temporal por el fotodetector, que enviará la señal a un osciloscopio donde se digitaliza y registra; la señal se analiza finalmente en ordenador con un programa de ajuste a exponenciales diseñado por el Dr. Pierre Sétif de Saclay. El sis-

tema consta también de varias lentes ópticas para focalizar y conducir adecuadamente la luz desde la fuente de emisión al fotodetector. Los experimentos se han realizado normalmente bajo condiciones controladas de potencial redox y de temperatura.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Función de los cuatro hemos del citocromo c*

El primer aspecto en que centré mis investigaciones fue establecer la función de los cuatro hemos del citocromo tetrahémico en el centro de reacción. Se conoce el potencial redox medio de los cuatro hemos (Dracheva et al. 1988), así como la posición de cada uno de ellos (Alegria y Dutton 1991; Dracheva et al. 1988; Nitschke y Rutherford 1989; Verméglio et al. 1989). En relación a P sería: c559 (+380 mV), c552 (+20 mV), c556 (+310 mV) y c554 (-60 mV). La denominación de cada hemo viene del máximo de absorción en la banda  $\alpha$  (Dracheva et al. 1986; 1988). Por tanto se trata de una secuencia de hemos de alto y bajo potencial alternativos, ordenación que constituye otro de los aspectos oscuros en relación a este citocromo.

A un potencial redox del orden de +250 mV los dos hemos de alto potencial (HP) se encuentran completamente reducidos. Tras la incidencia de un fotón de luz P transfiere un electrón a través de la bacteriofeofitina a  $Q_A$ . P en su estado oxidado,  $P^+$ , es reducido por el hemo proximal c559 con un tiempo de vida medio ( $t_{1/2}$ ) de 190 ns. Este hemo una vez fotooxidado recibe un electrón del hemo c556 con un  $t_{1/2}$  de 1,7  $\mu$ s. El hemo c559 es por tanto el donador final de electrones a P (Ortega y Mathis 1992; 1993). El hemo c556 suministra a c559 un electrón posibilitando dos actos fotoquímicos relativamente rápidos en el sistema. Como resultado  $Q_B$  se recibirá dos electrones y tomará dos protones saliendo del centro de reacción y contactando con el complejo bc<sub>1</sub> a través de la membrana. Tras el paso de los electrones por el citado complejo, proceso acoplado a la translocación de protones, los electrones vuelven al centro de

reacción en un flujo cíclico a través del citocromo soluble  $c_2$  (Knaff et al. 1991; Garcia et al. 1993). Hemos establecido que el citado citocromo reacciona con el tetrahemo mediante un mecanismo colisional en el que las fuerzas de atracción electrostática juegan un papel fundamental (Ortega et al. 1999). Para explicar el carácter monofásico de la reacción se ha postulado un mecanismo por el cual la vida media del complejo formado es extremadamente corta siendo necesarias varias interacciones para que se llegue a transferir el electrón.

Cuando el potencial redox del medio permite además la reducción del primer hemo de bajo potencial (LP)  $c_{552}$ , la transferencia de un electrón desde  $c_{559}$  se ve sustancialmente acelerada ( $t_{1/2}$  de 115 ns).  $c_{552}$  cede entonces un electrón a  $c_{559}$  con una cinética más rápida que el tiempo de resolución de aparato ( $< 40$  ns). Esta aceleración de la reacción se debe en nuestra opinión a un fenómeno de interacción electrostática interhémica, mediante el cual la presencia de un electrón en los hemos adyacentes al  $c_{559}$  determinaría un cambio en su potencial redox haciéndolo más reductor. Aumentaría por tanto la  $-\Delta G$  de la reacción y consiguientemente la constante de velocidad (Ortega y Mathis 1993; Mathis et al. 1994). Este fenómeno había sido predicho previamente de forma teórica por otros autores (Gunner y Honig 1991) que mediante cálculos basado en la estructura del centro de reacción de *Rps. viridis* habían postulado que la  $-\Delta G$  de la transferencia del hemo  $c_{559}$  a P se incrementa en 14 meV cuando el hemo  $c_{556}$  está reducido y en 77 meV si también lo está el hemo  $c_{552}$ . Estos cálculos fueron confirmados completamente por nuestros datos experimentales y permiten ratificar como buenos los parámetros físicos utilizados por los citados autores para describir cómo la proteína modula el potencial redox de los cuatro hemos: interacción de los hemos con sus propionatos y aminoácidos cargados, ligandos axiales y hemos previamente oxidados.

¿Por qué el citocromo posee cuatro hemos? Ha quedado establecido que los dos hemos de HP participan en el flujo cíclico de electrones mediante el cual se genera el gradiente electroquímico de protones base de la síntesis de ATP. Un sistema de dos hemos permitiría la reducción rápida de  $Q_B$  con dos electrones y por tanto su protonación y salida del centro de reacción. ¿Para qué sirven entonces los dos hemos de LP? Se ha postulado que podrían suministrar electrones provenientes de donadores de bajo potencial redox, lo que podría ser relevante en determinadas condiciones metabólicas y/o ambientales (Nitschke y Dracheva 1995). Nuestra hipótesis es que estos hemos podrían servir para separar físicamente los hemos de HP estableciendo la distancia apropiada entre ellos para obtener la velocidad de la reacción adecuada para el proceso. La existencia de dos hemos de HP a 5 Å de distancia alteraría el funcionamiento normal del citocromo en dos sentidos: i) provocaría una interacción electrostática muy fuerte con  $c_{559}$ ; ii) el segundo electrón enviado por el citocromo llegaría a  $Q_A$  antes de haber cedido el primero a  $Q_B$ ; esto provocaría una vuelta atrás del electrón, reacción improductiva por tanto, y que además puede generar especies dañinas. Existe la propuesta de una doble duplicación génica como origen de los cuatro hemos (Nitschke y Dracheva 1995). La presión evolutiva habría obligado a la proteína a establecer el potencial redox adecuado en cada hemo.

### ***Inhibición de la reacción a baja temperatura***

En los últimos 30 años diferentes grupos de investigación han estudiado el efecto de la temperatura en la fotooxidación de citocromos por centros de reacción en diversas especies de bacterias fotosintéticas (DeVault y Chance 1966; Kihara y Chance 1969). Los resultados permitieron establecer dos conclusiones: i) la reacción se inhibe a baja temperatura cuando se fotooxida un citocromo de alto potencial; ii) esta inhibición no ocurre si se fotooxida un hemo de bajo potencial. Estudiando este último tipo de reacción en la bacteria *Chromatium vinosum*, DeVault y Chance observaron un doble comportamiento de la constante de velocidad con la temperatura. Entre 300 K y 100 K la reacción se ralentizaba considerablemente, mientras que entre 100 K y 4 K no había efecto de la temperatura (DeVault y Chance 1966). Este segundo fenómeno resultó ser el primer caso documentado de reacción biológica independiente de temperatura y llevó a estos investigadores a proponer el mecanismo de Túnel Cuántico para explicar la transferencia electrónica entre proteínas. Estos experimentos han sido fundamentales en la elaboración de la teoría de la transferencia biológica de electrones. Sin embargo, como no se conoce la estructura del centro de reacción de la citada bacteria, todos los modelos se han referido a la estructura tridimensional conocida de *Rps. viridis*. Resultaba por tanto de gran interés investigar la misma reacción en esta especie para clarificar dos aspectos: i) ¿por qué se bloquea la reacción a baja temperatura?; ii) ¿se pueden generalizar los resultados de DeVault y Chance?; en otras palabras, ¿el túnel cuántico puede explicar la transferencia electrónica entre proteínas?

Los experimentos realizados con *Rps. viridis* confirmaron el fenómeno ya descrito de la inhibición de la transferencia de electrones entre el citocromo y el centro de reacción. Pusieron de manifiesto, además, que la citada inhibición era afectada considerablemente por el número de hemos reducidos, comportamiento que es posible explicar en función de la interacción electrostática interhémica descrita anteriormente. Así, el efecto de inhibición de la baja temperatura sería parcialmente compensado por el aumento considerable de la  $-\Delta G$  de la reacción conforme hay un mayor número de hemos reducidos. Parecía por tanto que la inhibición estaba relacionada con la  $-\Delta G$  de la reacción.

A temperaturas en que la reacción de transferencia de un electrón entre el hemo c559 y P está bloqueada, P<sup>+</sup> es reducido por un electrón proveniente de Q<sub>A</sub><sup>-</sup> con un  $t_{1/2}$  de 2,5 ms cuando sólo hay dos hemos reducidos; si está además reducido el hemo de bajo potencial c552, este cede un electrón a P<sup>+</sup> con un  $t_{1/2}$  de 1,1 ms. Esta reacción es sumamente interesante puesto que la velocidad de la reacción parece ser extremadamente rápida para la distancia a la que se encuentran ambos cofactores redox (24 Å). En efecto; recientemente el grupo del profesor Leslie Dutton ha propuesto que la distancia entre los cofactores redox sería la variable fundamental utilizada por las proteínas redox a la hora de obtener la constante de velocidad deseada para la reacción, pudiendo generar cambios de hasta 10<sup>12</sup> veces (Moser et al. 1992). Según su modelo, la reacción entre el hemo c552 y P<sup>+</sup> debería poseer una  $t_{1/2}$  del orden de 200 veces superior a la detectada experimentalmente por nosotros. Se trata en consecuencia del

primer caso de reacción fotosintética descrito que se aleja significativamente del modelo anterior. Un solapamiento de orbitales entre los hemo *c559* y *c552* podría explicar una velocidad superior a la esperada.

Hemos elaborado una hipótesis que intenta explicar el fenómeno de bloqueo de la transferencia de electrones entre el hemo *c559* y  $P^+$  a baja temperatura (Ortega y Mathis 1993; Mathis et al. 1994, Ortega et al. 1997; Ortega et al. 1998). Según la propuesta, el descenso en la temperatura induciría la transición de un estado del centro de reacción en que la citada transferencia es rápida ( $S_{HT}$ ) hacia otro estado en que la reacción es muy lenta o no puede medirse ( $S_{LT}$ ). ¿Cuál es la naturaleza física de esa transición? Una oxidación de los hemo a baja temperatura no parece ser la explicación puesto que se ha comprobado que su estado redox no se modifica con la temperatura. Un cambio en el estado físico del solvente (agua-glicerol) o en la distancia entre los cofactores no parece poder explicar tampoco el efecto redox en la inhibición.

A medio camino entre ambos cofactores existe un residuo de tirosina L162 que está conservado en todas las especies en que se ha secuenciado el centro de reacción (Williams et al. 1983; Youvan et al. 1984; Shiozawa et al. 1989). Numerosos autores han propuesto que la transferencia de electrones desde el hemo *c559* hasta  $P^+$  es rápida a temperatura alta porque el residuo de tirosina L162, situado entre ambos cofactores, puede adoptar una orientación adecuada para la reacción (Knapp y Fischer 1987; Knapp y Nilsson 1990; Cartling 1991, 1992 y 1993). A baja temperatura podría quedar congelado en una posición desfavorable bloqueando la reacción. En el laboratorio del profesor Dieter Oesterhelt se ha establecido el primer sistema para obtener mutantes específicos en *Rps. viridis*, lo que ha permitido reemplazar la tirosina L162 por diversos aminoácidos (Laussermaier y Oesterhelt 1992; Dohse et al. 1995). Mediante electroporación se introduce en la estirpe silvestre un plásmido que posee el operón *puf*, que codifica para las subunidades M, L y C del centro de reacción, con una delección (que incluye un inserto de resistencia a kanamicina). Se trata de un vector suicida por haberse eliminado el origen de replicación. Los mutantes delectivos con fenotipo *phor* se seleccionan bajo condiciones de microaerofilia en medio N con kanamicina. Mediante conjugación con células donadoras de *E. coli* S17-I se complementa la estirpe *phor* con plásmidos pRKMutx en los que se ha reemplazado por mutagénesis dirigida la tirosina L162Y por varios aminoácidos aromáticos y no aromáticos. Los mutantes específicos se seleccionan en medio con kanamicina y tetraciclina.

Utilizando los mutantes específicos obtenidos mediante este método (L162F, W, M, L, G y T) hemos investigado el papel de la tirosina L162 en la transferencia electrónica entre el hemo *c559* y  $P^+$  (Dohse et al. 1995; Ortega et al. 1997; Ortega et al. 1998). Los datos cinéticos permiten concluir que ni la tirosina ni el carácter aromático son requeridos en la posición L162 para que la reacción sea rápida. ¿Cuál es en ese caso la función de este residuo altamente conservado? En los mutantes no aromáticos L162G, L162T y L162L se observó que el porcentaje de centros de reacción en el que la reacción es rápida es bajo en relación a las otras estirpes. Sin embargo, presentan una segunda transferencia electrónica entre el *c559* y  $P^+$  de cinética 10 veces más lenta, que aunque también aparece en el resto, en estos tres mutantes ocurre en un porcentaje

mucho mayor de centros de reacción (20-30%). Hemos interpretado este fenómeno asumiendo que el papel de la tirosina sería estabilizar la formación de un complejo entre el citocromo y el centro de reacción que permitiría una reacción rápida. Los complejos con residuos no aromáticos en esa posición podrían adoptar otra conformación menos eficiente con el resultado de una transferencia más lenta.

La tirosina L162 no es responsable de la inhibición a baja temperatura de la transferencia de electrones desde el hemo *c*559 hasta P<sup>+</sup>, ya que este fenómeno también ocurre en todos los mutantes estudiados (Ortega et al. 1997; Ortega et al. 1998). Los mutantes no aromáticos presentan, sin embargo, una mayor proporción de centros de reacción en los que ocurre la reacción rápida a baja temperatura. Esto parece sugerir que la sustitución del residuo en la posición L162 afecta al parámetro físico responsable de la transición entre los dos estados propuestos. ¿Cuál es en consecuencia la causa de la transición? Nuestra hipótesis establece que el descenso de la temperatura induce una congelación progresiva de la proteína que afecta fundamentalmente a las moléculas de agua incluidas en la estructura del centro de reacción (Ortega y Mathis 1993; Ortega et al. 1997; Ortega et al. 1998). La inhibición de la reacción vendría originada por la congelación de determinadas redes de moléculas de agua lo que bloquearía los cambios estructurales de la proteína asociados normalmente a la reacción. Un efecto similar al de inhibición a baja temperatura de la reacción se ha observado en centros de reacción parcialmente deshidratados (Chamorovsky et al. 1986)

¿Por qué la reacción se inhibe de manera diferente en algunos mutantes? En la estructura del centro de reacción de *Rps. viridis* es posible observar la presencia de siete moléculas de agua organizadas en una red de puentes de hidrógeno que incluye la tirosina L162, y que conecta el hemo *c*559 y P<sup>+</sup> a través de los residuos de histidina C248 y de tirosina M195. Esta podría ser la red que participa en los cambios estructurales. La sustitución de la tirosina L162 por aminoácidos más pequeños (los no aromáticos) alteraría la red de moléculas de agua, en número o en posición, lo que modificaría el perfil de la inhibición. El agua interna podría ser por tanto un factor fundamental en el control de la oxidación del citocromo, contribuyendo posiblemente en la  $\Delta G$  y  $\lambda$  final del proceso.

### ***Efecto de la temperatura en la velocidad de la reacción***

Una vez investigada la inhibición de la reacción provocada por las bajas temperaturas interesaba conocer el efecto de este parámetro en la velocidad de la reacción. Pretendíamos, por una parte, determinar si el experimento pionero de DeVault y Chance en *Chromatium vinosum* (DeVault y Chance 1966, DeVault et al. 1967) se repetía en *Rps. viridis* y, en segundo lugar, establecer si el propuesto túnel cuántico era un mecanismo general para este tipo de procesos. Nuestros experimentos pusieron de manifiesto que la temperatura afectaba muy levemente a la velocidad de la oxidación del hemo *c*559 en cualquiera de las condiciones redox utilizadas (Ortega y Mathis 1992; 1993). La oxidación del hemo *c*552, detectada a bajo potencial redox, era además completamente

independiente de la temperatura. Se trata por tanto de un comportamiento muy diferente al observado por DeVault y Chance, lo que plantea la necesidad de reevaluar los modelos teóricos elaborados en base a estos experimentos.

De los datos obtenidos con la estirpe silvestre de *Rps. viridis* parecía intuirse que la oxidación del hemo c559 podría ser un proceso básicamente independiente de la temperatura. Pudimos confirmar esta hipótesis examinando el efecto de la temperatura en los mutantes de la tirosina L162 en los que la reacción no se inhibía completamente a temperaturas muy bajas. En estos mutantes (L126G, L, M y T) era posible estudiar la velocidad de la reacción entre 300 K y 4 K. Efectivamente, la velocidad de la reacción no se modificaba significativamente con la temperatura (Ortega et al. 1997; Ortega et al. 1998). La teoría de Marcus propone que este tipo de fenómenos se asocian a reacciones en que  $-\Delta G^\circ + \lambda = 0$ . En nuestro caso esto no es posible puesto que ambos valores son muy diferentes ( $-130$  meV *versus*  $400$  meV, respectivamente). Sugerimos por tanto que nuestra reacción está asociada a vibraciones de alta energía no afectadas por la temperatura. El grupo del profesor Dutton ha propuesto una explicación similar para interpretar la independencia de la temperatura de la constante de velocidad de muchas reacciones redox en los centros de reacción fotosintéticos.

### ***Relación entre cambio de energía libre y velocidad de la transferencia electrónica***

La teoría del profesor Rudolf Marcus sobre la transferencia de electrones establece una relación de tipo gaussiano entre el cambio de energía libre entre los estados final e inicial de la reacción y la tasa de esa reacción. Considerando que existen pocos sistemas biológicos donde se haya probado experimentalmente esta hipótesis, nos planteamos los profesores P. Mathis, James Allen del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Arizona y yo mismo la posibilidad de investigar esta propuesta estudiando la reacción de vuelta atrás del electrón desde  $Q_A^-$  hasta  $P^+$  en el centro de reacción de *Rhodobacter sphaeroides* (Ortega et al. 1996). Para ello se diseñaron y fabricaron mediante mutagénesis dirigida diversas estirpes en las que mediante sustitución de diversos residuos del entorno del par especial de bacterioclorofila se conseguía modificar el potencial redox del citado par. Así, mientras la estirpe silvestre posee un  $E'_m$  de  $+505$  mV si se elimina la citada interacción sustituyendo la histidina por fenilalanina el  $E'_m$  pasa a ser  $+410$  mV. Si se introducen residuos que pueden dar puentes de hidrógeno al par especial se puede conseguir la formación de dos, tres y hasta cuatro enlaces de hidrógeno, aumentando progresivamente el  $E'_m$  hasta  $+765$  mV. De esta forma es posible obtener toda una gama de  $-\Delta G^\circ$  para la misma reacción. El estudio de la velocidad de la reacción a diferentes temperaturas mediante espectroscopía láser nos permitió determinar que la tasa aumentaba con la  $-\Delta G^\circ$  como era esperable según el modelo de Marcus. Sin embargo, la mejor adecuación al citado modelo se obtenía asumiendo dos modos vibracionales de media y alta frecuencia y fundamentalmente una energía de reorganización dependiente de la temperatura. Estos resultados experimentales están permitiendo adaptar algunos aspectos de la teoría de Marcus a los sistemas biológicos.

## REFERENCIAS

- ALEGRIA, G. y P. L. DUTTON. 1991. II. Langmuir-Blodgett monolayer films of the *Rhodospseudomonas viridis* reaction center: determination of the order of the hemes in the cytochrome *c* subunit. *Biochim. Biophys. Acta.* 1057:258-272.
- ARNON, D.I. 1961. Cell-free photosynthesis and the energy conversion process. *En A Symposium on Light and Life*. W.D. McElroy y B. Glass, eds., The Johns Hopkins Press, Baltimore. 489-565.
- CARTLING, B. 1991. A mechanism of temperature dependent electron transfer reactions in biological system *J. Chem. Phys.* 95:317-322.
- CARTLING, B. 1992. An electron transfer switch in photosynthetic reaction centra. *Chem. Phys. Lett.* 196:128-132.
- CARTLING, B. 1993. A molecular mechanism of conformational gating of electron transfer in photosynthetic reaction centra. *Biophys. Chem.* 47:123-138.
- CHAMOROVSKY, S. K., A. A. KONONENKO, E. G. PETROV, I. I. POTTOSIN y A. B. RUBIN. 1986. Effects of dehydration and low temperatures on the oxidation of high-potential cytochrome *c* by photosynthetic reaction centers in *Ectothiorhodospira shaposhnikovii*. *Biochim. Biophys. Acta.* 848:402-410.
- DEISENHOFER, J., O. EPP, K. MIKI, R. HUBER y H. MICHEL. 1985. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution. *Nature.* 318:618-624.
- DEISENHOFER, J., O. EPP, K. MIKI y H. MICHEL. 1995. Crystallographic refinement at 2.3 Å resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodospseudomonas viridis*. *J. Mol. Biol.* 246:429-457.
- DEVAULT, D. y B. CHANCE. 1966. Studies of photosynthesis using a pulsed laser. Temperature dependence of cytochrome oxidation rate in *Chromatium*. Evidence for tunneling. *Biophys. J.* 6: 825-847.
- DEVAULT, D., J. H. PARKES y B. CHANCE. 1967. Electron tunnelling in cytochromes. *Nature.* 215:642-644.
- DOHSE, B., P. MATHIS, J. WACHTVEITL, E. LAUSSERMAIR, S. IWATA, H. MICHEL y D. OESTERHELT. 1995. Electron transfer from the tetraheme cytochrome to the special pair in the *Rhodospseudomonas viridis* reaction center: Effect of mutations of tyrosine L162. *Biochemistry.* 34:11321-11326.
- DRACHEVA, S. M., L. A. DRACHEV, A. A. KONSTANTINOV, A. Y. SEMENOV, V. P. SKULACHEV, A. M. ARUTJUNJAN, V. A. SHUVALOV y S. M. ZABEREZHNYAYA. 1988. Electrogenic steps in the redox reactions catalyzed by photosynthetic reaction-centre complex from *R. viridis*. *Eur. J. Biochem.* 171:253-264.
- DRACHEVA, S. M., L. A. DRACHEV, S. M. ZABEREZHNYAYA, A. A. KONSTANTINOV, A. YU. SEMENOV y V. P. SKULACHEV. 1986. Spectral, redox and kinetic characteristics of high-potential cytochrome *c* hemes in *Rps. viridis* reaction center. *FEBS Lett.* 205:41-46.
- GARCIA, D., P. RICHAUD y A. VERMÉGLIO. 1993. The photoinduced cyclic electron transfer in whole cells of *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1144:295-301.
- GUNNER, M.R. y B. HONIG. 1991. Electrostatic control of midpoint redox potential in the cytochrome subunit of the *Rhodospseudomonas viridis* reaction center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9151-9155.
- KIHARA, T. y B. CHANCE. 1969. Cytochrome photooxidation at liquid nitrogen temperatures in photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 189:116-124.
- KNAFF, D. B., A. WILLIE, J. E. LONG, A. KRIAUCIUNAS, B. DURHAM y F. MILLETT. 1991. Reaction of the cytochrome *c*<sub>2</sub> with photosynthetic reaction centers from *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochemistry.* 30:1303-1310.

- KNAPP, E. W. y S. F. FISCHER. 1987. Electron transfer and protein dynamics. *J. Chem. Phys.* 87: 3880-3887.
- KNAPP, E. W. y L. NILSSON. 1990. Protein dynamics in the photosynthetic reaction center: the electron transfer from cytochrome to the special pair. In *Perspectives in Photosynthesis*. J. Jortner, and B. Pullman, editors., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 389-412.
- LAUSSERMAIR, E. y D. OESTERHELT. 1992. A systema for site-specific mutagenesis of the photosynthetic reaction center in *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO J.* 11:777-783.
- LOSADA, M., M. NOZAKI y D. I. ARNON. 1961. Photoproduction of molecular hydrogen from thiosulfate by *Chromatium* cells. En *A Symposium on Light and Life*. W.D. McElroy y B. Glass, eds., The Johns Hopkins Press, Baltimore. 570-575.
- MARCUS, R. A. y N. SUTTIN. 1985. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochim. Biophys. Acta.* 811:265-322.
- MATHIS, P., J. M. ORTEGA y G. VENTUROLI. 1994. Interaction between cytochrome *c* and the photosynthetic reaction center of purple bacteria: Behaviour at low temperature *Biochimie.* 76: 569-579.
- MITCHELL, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* (London) 191:144-148.
- MOSER, C. C., J. M. KESKE, K. WARNCKE, R. S. FARID y P. L. DUTTON. 1992. Nature of biological electron transfer. *Nature.* 355:796-802.
- NITSCHKE, W. y A. W. RUTHERFORD. 1989. Tetraheme cytochrome *c* subunit of *Rhodospseudomonas viridis* characterized by EPR. *Biochemistry.* 28:3161-3168.
- NITSCHKE, W. y S. M. DRACHEVA. 1995. Reaction center associated cytochromes. En *Anoxy-genic Photosynthetic Bacteria*. R. E. Blankenship, M. T. Madigan, and C. E. Bauer, eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 776-805.
- ORTEGA, J. M. y P. MATHIS. 1992. Effect of temperature on the kinetics of electron transfer from tetraheme cytochrome to the primary donor in *Rhodospseudomonas viridis*. *FEBS Lett.* 301:45-48.
- ORTEGA, J. M. y P. MATHIS. 1993. Electron transfer from the tetraheme cytochrome to the special pair in isolated reaction centers of *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochemistry.* 32:1141-1151.
- ORTEGA, J.M., P. MATHIS, J.C. WILLIAMS y J.P. ALLEN. 1996. Temperature dependence of the reorganization energy for charge recombination in the reaction center from *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 35:3354-3361
- ORTEGA, J. M., B. DOHSE, D. OESTERHELT y P. MATHIS. 1997. Very fast electron transfer from cytochrome to the bacterial photosynthetic reaction center at low temperature. *FEBS Letters.* 401: 153-157
- ORTEGA, J.M., B. DOHSE, D. OESTERHELT y P. MATHIS. 1998. Low temperature electron transfer from cytochrome to the special pair in *Rhodospseudomonas viridis*: Role of the L162 residue. *Biophysical Journal* 74:1135-1148.
- ORTEGA, J.M., F. DREPPER y P. MATHIS. 1999. Electron transfer between cytochrome *c*<sub>2</sub> and the tetraheme cytochrome *c* in *Rhodospseudomonas viridis* Photosynt. Res. 59:147-157.
- SHIOZAWA, J. A., F. LOTTSPEICH, D. OESTERHELT y R. FEICK. 1989. The primary structure of the *Chloroflexus aurantiacus* reaction-center polypeptides. *Eur. J. Biochem.* 180:75-84.
- VERMEGLIO, A., P. RICHAUD y J. BRETON. 1989. Orientation and assignment of the four cytochromes hemes in *Rhodospseudomonas viridis* reaction centers. *FEBS Lett.* 243:259-263.
- WILLIAMS, J. C., L. A. STEINER, R. C. OGDEN, M. I. SIMON y G. FEHER. 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:6505-6509.
- YOUVAN, D. C., E. J. BYLINA, M. ALBERTI, H. BEGUSH y J. E. HEARST. 1984. Nucleotide and deduced polypeptide sequences of the photosynthetic reaction-center, B870 antenna, and flanking polypeptides from *R. capsulata*. *Cell* 37:949-957.