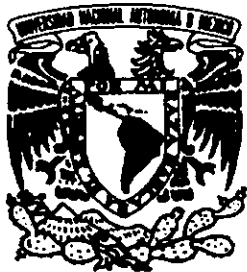


88
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL
COMPLEJO COLECTOR DE LUZ PCP EN
Gymnodinium linucheae”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A

P R E S E N T A:

PILAR ALEJANDRA PEREZ PEREZ

27-1388

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ROBERTO IGLESIAS PRIETO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

1999



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL
COMPLEJO COLECTOR DE LUZ PCP EN
Gymnodinium linucheae”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A

P R E S E N T A:

PILAR ALEJANDRA PEREZ PEREZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: ESTUDIOS PROFESIONALES
DR. ROBERTO IGLESIAS PRIETO

1999

28.
201



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL COMPLEJO COLECTOR DE LUZ PCP EN
Gymnodinium tinucheae"

realizado por PILAR ALEJANDRA PEREZ PEREZ

con número de cuenta 8700314-9 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

ROBERTO IGLESIAS P.
DR. ROBERTO IGLESIAS PRIETO

Propietario

DRA. LUISA ALBA LOIS

Propietario

M EN C. LAHOUCINE ACHNINE LAMTI

Suplente

I.Q. BLANCA NATALIA AYALA SCHIAFFINO

Suplente

FACULTAD DE CIENCIAS
DR. GUILLERMO SALGADO MALDONADO

Consejo Departamental de Biología
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

El océano produce la mayoría del oxígeno que respiramos, regula el clima y genera las lluvias.

Vivimos por que el mar vive



A mis padres por su apoyo, consejos y amor.

A mis hermanos que siempre estuvieron apoyándome.

A mis amigos por tener en quien confiar,
y por los momentos que hemos disfrutado.

A mis Profesores.

A mi Jurado, especialmente a mi director de tesis.

A la UNAM.

A todos ellos GRACIAS.
Pilar Alejandra Pérez Pérez.

INDICE

ANTECEDENTES	1
DESARROLLO EXPERIMENTAL	10
Extracción de dinoflagelados simblontes	10
Conteo de células	10
Extracción de Pigmentos Fotosintéticos	10
Aislamiento del PCP	11
Análisis electroforético del complejo proteína-pigmento	13
Análisis espectroscópico	13
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	27
ABREVIATURAS	34
REFERENCIAS	35

ANTECEDENTES

La fotosíntesis es la conversión de energía lumínica en energía química, esta conversión es realizada por plantas y algunas bacterias, las algas comprenden 11 filas siendo el grupo más diverso y representativo dentro del Reino de las Plantas, la clasificación de estas se basa en sus pigmentos fotosintéticos (Larkum y Barrett 1983). En estos eucariontes la fotosíntesis se lleva a cabo en organelos llamados cloroplastos, en el interior de éstos se encuentran los tilacoides lugar donde se localiza la maquinaria fotosintética. En el ámbito funcional la maquinaria fotosintética está organizada en dos tipos de complejos proteína-pigmento; (I) los complejos antena cuyas funciones son la absorción de luz (captura de fotones), la transferencia de energía de excitación a los centros de reacción y la relajación de excitación en forma de calor cuando las condiciones de luz son super saturantes; y (II) los centros de reacción en donde se lleva a cabo la fotoquímica primaria o separación de cargas. Se conocen tres clases de pigmentos fotosintéticos: las clorofilas, las ficobilinas y los carotenoides teniendo una distribución diferencial en los diferentes grupos de plantas superiores, algas, diatomeas y cianobacterias. El dinoflagelado fotosintético *Gymnodinium linucheae* se encuentra dentro del grupo Pyrrofitas.

En lo que respecta a los complejos colectores de luz (antenas), se sabe que los pigmentos siempre se encuentran unidos a proteínas en las estructuras fotosintéticas (Lee y Thornber 1995; Markwell *et al.* 1979). Existen dos tipos de holoproteínas: (a) las ficobiliproteínas donde el cromóforo presenta una estructura de tetrapirrol abierto, el cual está enlazado covalentemente a la apoproteína además de ser soluble en agua; este tipo de antena está presente en grupos como las cianobacterias y las algas rojas, y (b) los complejos proteína-clorofila en donde los cromóforos están unidos no covalentemente a proteínas específicas, además de ser insolubles (en general) en agua; este tipo de complejos se encuentra en plantas verdes y algas (Markwell *et al.* 1979). En estudios realizados sobre los dinoflagelados fotosintéticos, se encontró que los pigmentos responsables de coleccionar la luz son además de la clorofila *a*, la clorofila

c_2 y peridina (Prézelin, 1976), ya que estos dos pigmentos accesorios transfieren la energía absorbida a la clorofila *a* con una eficiencia cercana al 100% (Govindjee *et al.* 1979). Los carotenoides forman un grupo diverso de pigmentos fotosintéticos presentes en todos los productores primarios. En adición a la transferencia de energía de excitación, los carotenoides juegan un papel importante protegiendo a la clorofila *a*. Dentro de los carotenoides en las algas los más abundantes colectores de luz son la fucoxantina junto con la peridina. Estos pigmentos absorben la energía en el rango del azul-verde (470 a 550 nm), y potencialmente son pigmentos fotoprotectores (Song *et al.* 1976; Koka y Song, 1977).

Recientes avances en los métodos de fraccionación de los cloroplastos han permitido el aislamiento de cuatro complejos proteína-pigmento funcionales de las membranas fotosintéticas de dinoflagelados (Hiller *et al.* 1993; Iglesias-Prieto *et al.* 1993). Estos complejos contienen más del 80% de los pigmentos fotosintéticos presentes en las células (Iglesias-Prieto *et al.* 1993). En el caso particular del aparato fotosintético de dinoflagelados, los complejos antena incluyen un componente soluble en agua conocido como PCP por sus siglas en inglés (complejo proteína-peridina-clorofila *a*) (Prézelin 1976; Iglesias-Prieto *et al.* 1991), y un componente integral de las membranas fotosintéticas conocido como acpPC (complejo proteína-clorofilas *a/c*-peridina), este último complejo se caracterizó de forma independiente por Hiller *et al.* (1993) e Iglesias-Prieto *et al.* (1993).

El primer complejo proteína-clorofila *a*-peridina (PCP) se extrajo de la ruptura celular de dinoflagelados fotosintéticos aislándose y caracterizándose parcialmente por Haidak *et al.* (1966). Este complejo está asociado con otros componentes del aparato fotosintético, absorbiendo energía en la zona azul-verde del espectro fotosintéticamente activo y transfiriendo la excitación con alta eficiencia a los centros de reacción fotoquímicos; además de ser el único sistema colector de luz soluble en agua dentro de la División Cromofita (Iglesias-Prieto 1996).

El PCP es característico de dinoflagelados donde varios complejos proteína-pigmento han sido aislados y caracterizados (Haxo *et al.* 1976; Prézelin y Alberte 1978; Govind *et al.* 1990), y en varias especies de ellos las proporciones molares de pigmentos peridinina: clorofila han sido variables teniendo una estequiometría de 8-12 moléculas de peridinina y sólo dos moléculas de clorofila *a* (Hofmann *et al.* 1996; Ogata *et al.* 1994). El análisis de su estructura cuaternaria indica que el PCP presenta características monoméricas con una apoproteína de 31-35 KDa aproximadamente u homodiméricas con dos subunidades polipeptídicas de entre 15-17 KDa cada una; algunas especies de dinoflagelados poseen una de las formas de manera exclusiva, mientras que otras pueden tener ambas (Govind *et al.* 1990, Iglesias-Prieto *et al.* 1991). Se ha demostrado que las características espectroscópicas de la clorofila *a* como la localización del pico máximo de absorción de la clorofila *a* dependen en parte de la estructura cuaternaria de la holoproteína PCP (Iglesias-Prieto *et al.* 1991). El PCP ha sido fraccionado utilizando técnicas de electroforésis de enfoque isoeléctrico (IEF) caracterizando varias isoformas (Chang y Trench 1982; Chang y Trench 1984; Iglesias-Prieto *et al.* 1991; Prézelin y Haxo 1976). De manera adicional, se ha demostrado que los patrones isoeléctricos de PCP, aislado de simbioses de diferentes hospederos invertebrados, son conservados en dinoflagelados en cultivo (Chang y Trench 1982). Recientemente por medio de fraccionación utilizando una técnica de cromatografía en columna Q-Sefarosa, el PCP de varias especies de dinoflagelados fue aislado en presencia y en ausencia de un inhibidor de proteasas (Ogata y Kodama 1993; Ogata *et al.* 1994). En ausencia de dicho inhibidor, los patrones de elución mostraron varias isoformas de PCP; en contraste con los resultados en presencia del inhibidor dando como resultado una sola forma de PCP. Aparentemente las isoformas de PCP fueron resultado de la degradación de una sola holoproteína (Ogata y Kodama 1993; Ogata *et al.* 1994).

Análisis de DNA de dos especies que representan estructuras cuaternarias, monoméricas y diméricas fueron secuenciadas indicando que las isoformas de

PCP pueden ser codificados por varios genes (Triplett *et al.* 1993). Comparando las secuencias del DNA de PCP con la de genes que codifican proteínas colectoras de luz mostraron tener poca similitud, sugiriendo que el PCP tiene un origen diferente al de otras proteínas con funciones análogas (Norris y Miller 1994; Triplett *et al.* 1993). Así, los trabajos sobre DNA y la secuencia de la proteína indicaron que el origen de las isoformas monoméricas y diméricas de PCP está apoyada en parte por la expresión diferencial de genes distintos, indicando que cada isoforma puede ser codificada por un gen, pudiendo ser acentuada la formación de isoformas por actividad proteolítica (Ogata *et al.* 1994).

Recientemente, la estructura tridimensional del PCP se resolvió usando técnicas de difracción de rayos X, con una resolución de 2.0 angstroms (Hofmann *et al.* 1996). El cristal de PCP aislado del dinoflagelado *Amphidinium carterae* reveló una conformación de trímero en donde cada una de las subunidades está plegada de manera que presenta una cavidad hidrofóbica donde se encuentran dos moléculas de lípidos, ocho peridininas y dos moléculas de clorofila *a* (Figura 1). Las clorofilas están completamente rodeadas de un ambiente hidrofóbico, donde la mitad de su área superficial está cubierta por peridininas, un tercio está cubierto por la proteína y una sexta parte por lípidos (Hofmann *et al.* 1996).

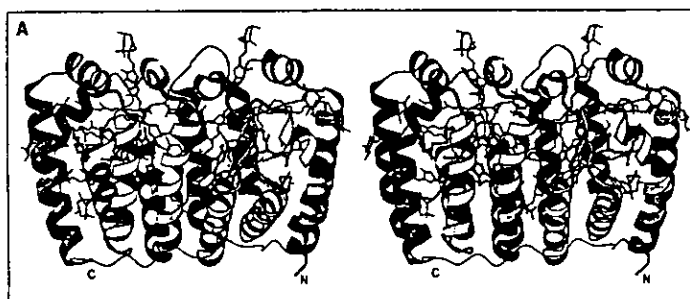


Figura 1. - Estructura de un monómero de PCP. (Hofmann, E. *et al.* 1996)

El fundamento estructural que explica la eficiente transferencia de energía de la peridina a la clorofila esta basado en la observación de la estructura del PCP, donde las peridinas se encuentran alrededor de las clorofilas casi en contacto (Hofmann *et al.* 1996). El complejo colector de luz de plantas superiores (LHCII por sus siglas en inglés) ha sido resuelto por difracción de electrones (Kuhlbrandt *et al.* 1991; Fujiohshi 1994), pero a diferencia, el PCP es un complejo cuyo aislamiento se facilita por ser soluble en agua, además que al presentar solamente dos moléculas de clorofila *a* posee características espectroscópicas más simples.

El aparato fotosintético de productores primarios en condiciones de luz sub-saturante, sufre modificaciones permitiendo así utilizar de manera efectiva la cantidad de fotones disponibles, expresando diferencialmente el genoma para una foto-aclimatación. Las respuestas en la foto-aclimatación incluyen la regulación de la expresión diferencial de algunos componentes asociados con la antena fotosintética, incrementando la concentración celular de la mayoría de las moléculas como los complejos proteína-clorofila PCP y acpPC, los cuales están asociados a los centros de reacción del aparato fotosintético representando los principales complejos colectores de luz del grupo de dinoflagelados (Iglesias-Prieto y Trench 1997 a y b). Esta foto-aclimatación incrementa el potencial en la captura de fotones para la fotosíntesis (Prézellin 1987). En las algas, cerca del 70% de los fotones absorbidos por la antena son utilizados para la fotosíntesis.

Cuando la intensidad luminosa es saturante (superior a la capacidad fotosintética), los productores primarios responden produciendo vías no fotoquímicas para la desactivación del exceso de excitación de la clorofila *a* (Horton *et al.* 1996). Se protegen de un fotodaño por disipación del exceso de energía (Krause 1988). Un gran número de procesos compiten por la desactivación de estos pigmentos en la antena fotosintética como lo son: La fluorescencia, la transferencia de excitación, las reacciones de fotoquímica y la desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia (Krause y Wels 1991).

La inducción de disipación de energía se puede medir como la desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia (qN por sus siglas en inglés), el cual es un proceso heterogéneo y complejo que puede ser cuantificado por mediciones de fluorescencia de la clorofila a , notándose una baja en la cosecha cuántica asociada con el cierre de los centros de reacción (Krause y Weis 1991). Esta desactivación no-fotoquímica del exceso de energía de excitación se lleva a cabo en la antena fotosintética (Horton *et al.* 1996), promoviendo una vía alternativa de la excitación cuando la capacidad de transporte de electrones de los fotosistemas está saturada, ya sea por limitaciones en términos de aceptores de electrones o por exceso de energía luminosa (Krause 1988; Demming-Adams y Adams 1992).

Muchos componentes de qN han sido identificados (Walters y Horton 1991), pero se sabe que la mayor parte de qN ocurre en respuesta a un gradiente de pH, más específicamente a la acidificación del lumen tilacoidal. Esta acidificación resulta de dos procesos: (I) la fotólisis del agua, dando como resultado 4 protones por cada dos moléculas de agua y, (II) del transporte de electrones, por lo que los protones del estroma son transferidos al espacio del lumen, a través de la membrana del tilacoide, y son por consecuencia utilizados para la síntesis de ATP (Gregory 1989). Este qN se llama qE (dependiente de la energía) siendo éste el que más contribuye a qN . Varios estudios han demostrado que qE es un factor importante en la reducción reversible de la eficiencia fotoquímica en alta irradianza (Weis y Berry 1987) y provee protección ante la fotoinhibición del fotosistema II (Krause *et al.* 1986). Como resultado qE juega un papel importante en el proceso de regulación de la fotosíntesis (Horton y Ruban 1994).

Investigaciones indican que en plantas superiores y algas verdes, la desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia dependiente de la energía qE ; está fuertemente correlacionada con el ciclo de las xantofilas dando lugar a la depoxidación del carotenoide violaxantina a zeaxantina (Demming-Adams 1990) (Figura 2a), indicando un incremento en el número de dobles enlaces C-C por lo que de ser un pigmento encargado de transferir energía a la clorofila a

con alta eficiencia la violaxantina (Owens *et al.* 1987), pasa a ser una zeaxantina que desactiva los estados excitados de la clorofila (Demming *et al.* 1987). El hecho de que las xantofilas estén localizadas exclusivamente en el complejo colector de luz o antena fotosintética, provee fundamentos para la participación activa de la antena fotosintética del PSII en qE (Peter y Thornber 1991).

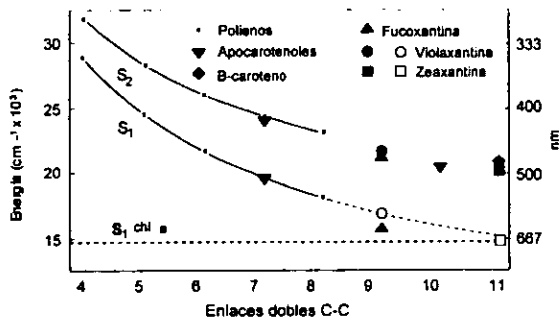


Figura 2a. - Energía de diversos carotenoides y polienos en función del número de enlaces conjugados dobles C-C (-) Aproximación empírica, datos de Kohler *et al.* (1988); (---) extrapolación de los datos de Kohler *et al.* (1988).

En varias especies de dinoflagelados y diatomeas que contienen clorofila *c*, se detectó que en condiciones super-saturantes de luz existe un enriquecimiento de xantofilas foto-protectoras diadinoxantina y diatoxantina, las cuales están implicadas en la disipación del exceso de energía de excitación (Olaizola y Yamamoto, 1994; Iglesias-Prieto y Trench 1997). Se sabe que la acumulación de diatoxantina, en condiciones de alto flujo de electrones, puede estar correlacionado con un incremento en la capacidad de disipación térmica de la excitación en la antena colectora de luz para de esta forma proveer protección evitando un fotodaño al fotosistema II bajo condiciones super-saturantes de luz (Olaizola y Yamamoto, 1994). El mayor reservorio de éstas xantofilas foto-protectoras en dinoflagelados es el acpPC (Iglesias-Prieto *et al.* 1993).

El rango de tolerancia de flujo de fotones de una especie de simbiote particular es función a su habilidad de foto-aclimatación. Por ejemplo, la capacidad de diferentes especies de simbiotes a incorporar xantofilas fotoprotectoras en el acpPC tiene un impacto, definiendo los límites superiores de distribución de las especies manteniendo altas eficiencias fotosintéticas; así la baja densidad de flujo de fotones que puede tolerar define los límites inferiores de distribución de los organismos (Iglesias y Trench 1997). El proceso de aclimatación, regulación y protección son los responsables de mantener la alta eficiencia fotosintética durante fluctuaciones ambientales (Yang *et al.* 1998).

Para que se lleve a cabo la desactivación no-fotoquímica, Horton y Ruban (1991) propusieron un modelo para explicar la producción de un desactivador de la energía de excitación por agregación de antenas o colectores de luz en el interior de la membrana del tilacoide donde la energía podría ser disipada. En este modelo, se dice que cuando existe cierta distancia entre pigmento-pigmento, la antena o complejo colector de luz se encuentra en estado relajado llevándose a cabo la transferencia de energía, pero al protonarse algún aminoácido, fenómeno regulado por el pH del lumen del tilacoide (Ruban *et al.* 1993), la distancia entre pigmentos se minimiza formando un agregado de pigmentos que ahora realizan la disipación de energía en forma de calor (Figura 2b), lo que mantiene en orden y balance el rango entre la luz absorbida y la utilización de luz bajo condiciones de fluctuaciones ambientales evitando un fotodaño (Ruban *et al.* 1993; Horton y Ruban 1994).

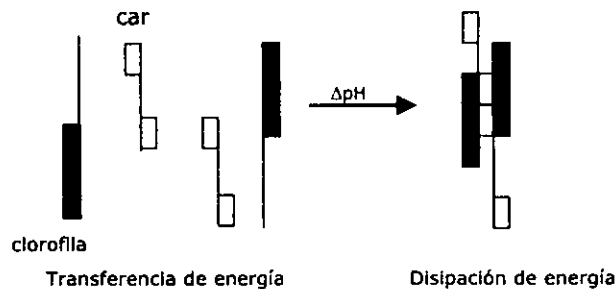


Figura 2b.- Modelo de la interacción entre las xantofilas y clorofilas en el complejo colector de luz, dependiente del ΔpH . (Horton y Ruban, 1993).

La habilidad para evocar éste y otros mecanismos de fotoprotección es fundamental para garantizar la supervivencia de los organismos bajo condiciones generales de estrés (Owens 1988). Pese a la importancia que tiene este tipo de regulación en el aparato fotosintético de los productores primarios poco es lo que se conoce de las bases bioquímicas de dicho fenómeno. El estudio de los mecanismos moleculares de la desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia ha sido limitado por un lado, por la complejidad espectral de los complejos colectores de las plantas verdes y por otro lado, por la ausencia de sistemas de estudio *in vitro*. En este sentido, el sistema de colección de luz de dinoflagelados PCP, no sólo actúa como complejo colector de luz o antena fotosintética sino que también puede funcionar cuando las condiciones de intensidad luminosa son superiores a la capacidad fotosintética (condiciones saturantes) ofreciendo la potencialidad de ser un sistema de fotoprotección evocando la desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia, variando su tasa de desactivación térmica evitando que tal exceso de energía cause daños permanentes al aparato fotosintético.

Considerando ahora la importancia que tiene el estudio de los complejos colectores de luz el PCP del dinoflagelado *Gymnodinium linucheae* simbiote de la medusa *Linuche unguiculata* (Trench y Thinh 1995), se tomará como sistema de estudio para documentar las variaciones en la cosecha cuántica de la fluorescencia del complejo PCP *in vitro* en función de variaciones en el pH de la solución en la que se diluyen las distintas holoproteínas de PCP, obtenidas durante su purificación.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

Extracción de dinoflagelados simbioses

La extracción de dinoflagelados simbioses se realizó usando medusas *Linuche unguiculata*, las cuales fueron colectadas en la laguna arrecifal Puerto Morelos, Q.Roo. Para esto se utilizó un equipo de redes de plancton estándar de 0.40 metros de diámetro en la boca, 1.5 metros de longitud y abertura de malla de 300 μm . Las medusas se colocaron en recipientes de plástico con agua de mar eliminando pastos marinos y basura, así también se cuidó de tener la menor cantidad de agua de mar para proceder a licuar y homogeneizar a los organismos. Las medusas se licuaron hasta que el tejido estuviera totalmente macerado, posteriormente el tejido se centrifugó a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada modelo Marathon 22KBR Fisher); desechando el sobrenadante con tejido animal y resuspendiendo la pastilla en agua de mar, filtrada (Millipore 0.45 μm). Este procedimiento se repitió 3 veces hasta observar al microscopio un sobrenadante libre de tejido animal y tener un concentrado de dinoflagelados simbioses *Gymnodinium linucheae* (Trench y Thinh 1995). Finalmente, las células se resuspendieron en 50 mL de agua de mar filtrada.

Conteo de células

Se tomaron 100 μL del concentrado de 50 mL de células simbioses, los cuales se diluyeron en una proporción 1:10 utilizando agua de mar filtrada y se determinó la cantidad de células presentes en la muestra mediante un conteo usando un hemocitómetro. El conteo se realizó por quintuplicado.

Extracción de Pigmentos Fotosintéticos

Simultáneamente las muestras de células simbioses se sometieron a un proceso de extracción de pigmentos utilizando acetona-dimetil sulfóxido

(DMSO) (90:10, v: v) (Iglesias-Prieto *et al.* 1992). Las células se centrifugaron hasta obtener una pastilla la cual se resuspendió en 900 μL de acetona centrifugándose a 735 x g en una centrifuga clínica (marca Solbat), el sobrenadante con pigmentos se guardó; la pastilla se resuspendió en 25 μL de DMSO mezclándose vigorosamente por 30 seg. en un Vortex, agregando finalmente el sobrenadante de acetona a la muestra extraída con DMSO clarificando el extracto por centrifugación (1 minuto) a 735 x g. Esta operación se repitió de 2 a 3 veces hasta obtener una pastilla blanca, para posteriormente transferir la muestra a una celda de cuarzo de 1 centímetro de paso óptico realizando lecturas espectrofotométricas de absorbancia de cada muestra a 630, 663 y 725 nm, utilizando un espectrofotómetro marca Beckman (modelo 35). Las concentraciones de Chl *a* y Chl *c*₂ se determinaron usando las ecuaciones de Jeffrey and Humphrey (1975). Las concentraciones de la clorofila *a* en el complejo proteína-clorofila se calcularon usando el coeficiente de extinción molar de 60 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Shiozawa *et al.* 1974).

Aislamiento del PCP

El PCP se purificó siguiendo los métodos descritos por Prézélin y Haxo (1976) y Chang y Trench (1982) con algunas modificaciones. Una vez aislados los dinoflagelados simblontes se concentraron por medio de centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos a 4°C desechando el sobrenadante (tejido animal) y repitiendo estos pasos tres veces. Posteriormente, se centrifugó a 6700 x g (10 minutos) obteniendo una pastilla la cual se resuspendió en 50 mL de amortiguador frío TM [100 mM Tris-HCl pH 8.0; 2mM MgCl_2 , 2mM NaEDTA] (Iglesias-Prieto *et al.* 1993). Las células intactas se observaron mediante un microscopio. Posteriormente, se utilizó una Prensa de French (Aminco) a 7.8×10^7 Pa con el fin de romper las células. Este procedimiento se llevó a cabo tres veces debido a que después de cada rompimiento celular se estimó la cantidad de células rotas observando una alícuota al microscopio; después del tercer rompimiento celular se observó un 99% en promedio de células rotas. El material lisado se centrifugó a 500 x g a 4°C durante 10 minutos en una

centrífuga Marathon 22KBR Fisher, con el propósito de eliminar las células no rotas y desechos celulares, así la coloración presente en el sobrenadante se debe al cromóforo del PCP. El PCP crudo, obtenido de la centrifugación, fue tratado con sulfato de amonio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ al 50% de saturación agitándose hasta que se disolviera, posteriormente se centrifugó a $10\ 500 \times g$ durante 2 horas a 4°C en una centrífuga Marathon 22KBR Fisher. El PCP soluble en agua se recuperó en el sobrenadante. Separando en la pastilla las membranas tilacoidales y desechos celulares; el sobrenadante se trató con 100% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ agitando la muestra durante 2 horas, posteriormente se centrifugó a $20000 \times g$ por toda una noche a 4°C . Lo que resultó precipitado fue la fracción que contenía PCP, la cual fue resuspendida en 18 mL de amortiguador TM. La fracción se sometió a un proceso de diálisis en frío contra amortiguador TMS (TM, con 500mM NaCl); se utilizaron bolsas de diálisis de 23 mm de diámetro con un límite de exclusión de 6000 a 8000 daltones (la bolsa de diálisis se trató previamente con una solución de carbonato de calcio al 2% y EDTA 2mM calentándose a 80°C durante 10 minutos). En el transcurso del proceso de diálisis se hicieron dos recambios totales de amortiguador TM para concentrar el PCP aislado hasta 8 mL usando una cama de polietilen glicol (masa molecular 10 000 KDa). Todo el procedimiento de aislamiento se llevó a cabo bajo luz tenue para minimizar la fotodestrucción de los pigmentos.

Una vez aislada y concentrada la muestra de PCP en 8 mL, se utilizó una columna Sephadex G-200 como absorbente, se realizaron 8 corridas de 1 mL cada una eluyendo con amortiguador TMS [100 mM Tris-HCl pH 8.0; 2mM MgCl_2 ; 2mM NaEDTA; 500 mM NaCl]. Se utilizó este método para separar partículas según su tamaño, eluyendo en orden decreciente de peso molecular. Durante el perfil de elución se colectaron fracciones de 1 mL, de las cuales se determinó la absorbancia a 480 nm, y 280 nm, utilizando un espectrofotómetro Beckman (modelo 35); se calculó el cociente $\text{abs } 480 \text{ nm} / \text{abs } 280 \text{ nm}$.

De las fracciones eluidas en la columna G-200 se dializaron aquellas de mayor cociente contra amortiguador TM y se concentraron en una cama de polietilen glicol hasta obtener una muestra de PCP color marrón oscuro en el menor volumen posible. Posteriormente, se utilizó una columna Sephadex G-25

para desalinizar la muestra y tener un buen recambio en el amortiguador asegurando que la muestra estuviera libre de sal. Las muestras se purificaron por medio de una columna de intercambio aniónico Q₂ (Laboratorios Bio-Rad) integrada a un FPLC (por sus siglas en inglés), la cual se eluyó con Tris 1mM pH 8; con un gradiente de 0 a 0.2 M de NaCl. Durante el corrimiento de la muestra se monitoreó la concentración de sal en el eluyente con una celda de conductividad, así como la absorbancia del complejo mediante el uso de un detector Integrado al FPLC midiendo a una longitud de onda de 280 nm; logrando fraccionar la muestra en dos.

Cada corrida en la columna Q₂ se hizo de 1 mL de muestra diluida (1:1) en amortiguador de elución Tris obteniendo las dos fracciones (baja en sal y alta en sal, respectivamente). Una vez separadas las 2 fracciones de PCP en cada corrida se dializaron contra una solución de glicina al 3%.

Análisis electroforético del complejo proteína-pigmento

Muestras de cada estado de purificación del complejo Proteína-Clorofila *a* Peridina (PCP), conteniendo cantidades iguales de clorofila *a* (30 nanogramos), fueron separadas usando el método de electroforesis en gel de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) al 12%. Este método electroforético fue usado para determinar el número de proteínas que componen la muestra además de evaluar su homogeneidad. Las bandas de proteínas fueron detectadas por tinción de plata (Sigma) (Poro *et al* 1982), así mismo se utilizaron estándares de bajo peso molecular (Sigma) con la finalidad de determinar el peso molecular de las apoproteínas.

Análisis espectroscópico

Los espectros de absorción del PCP se obtuvieron utilizando un Espectrofotómetro SLM-AMINCO UV-VIS (modelo DW-2C) acoplado a un controlador OLIS (On-line Instruments Systems, Inc), el cual está conectado a una computadora con sistema OLIS para digitalizar el espectro. Los espectros tanto de la muestra de PCP crudo como el de las fracciones 1 y 2 se midieron

dentro del rango de luz visible (350- 750 nm). Los espectros de absorción fueron obtenidos de un promedio de 10 registros. Los espectros fueron normalizados al pico máximo de absorción de la clorofila *a* de las dos fracciones. La clorofila *a* se cuantificó usando el coeficiente de extinción molar de $60 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Schiozawa *et al.* 1974).

Los espectros de emisión y excitación se realizaron utilizando un espectrofluorómetro (SLM Instruments, Inc) conectado a una computadora con sistema SABLE digitalizando así los espectros de las dos fracciones de PCP. El espectro de emisión se logró haciendo un barrido, capturando 640 datos dentro de la porción roja del espectro de luz (600-740 nm), las muestras fueron excitadas a 480 nm. El espectro de excitación se hizo de (400-700 nm) capturando 2650 datos. Los espectros no fueron corregidos.

Además, se midieron las variaciones en la fluorescencia de las dos fracciones de PCP obtenidas de la cromatografía de intercambio aniónico pero en soluciones a diferentes pH de 1-9 para lo cual se tomaron cantidades de PCP con la misma absorbancia (0.03) para minimizar la desactivación de fluorescencia. Las muestras fueron diluidas en glicina al 3% en una proporción 1:4, las cuales se excitaron a 480 nm, en el pico de la peridina registrando la señal de fluorescencia máxima de emisión a 672 nm.

Para las fracciones 1 y 2 se tomaron los valores de emisión máxima en 672 nm teniendo las muestras a las mismas concentraciones de absorbancia sacando así la cosecha cuántica de la fluorescencia *qY* (por sus siglas en inglés) para ambas fracciones.

RESULTADOS

Las medusas colectadas en la Laguna arrecifal del Parque Marino Puerto Morelos, se licuaron y homogeneizaron separando el tejido animal de la medusa *Linuche unguiculata* (Trench y Thinh 1995). Las células de *Gymnodinium linucheae* se concentraron en 50 mL, determinándose la cantidad de clorofila *a* utilizando acetona-dimetil sulfóxido (90:10, v: v) (Iglesias-Prieto *et al.* 1992) obteniendo 14.81 mg (Cuadro 1). La densidad de células extraídas fue de 9.19×10^7 células por mililitro.

Cuadro 1.- Cuantificación de clorofila *a* en diferentes fracciones durante el proceso de purificación del Complejo Proteína-Clorofila *a*-Peridínina. Se empezó con 14.8 mg de clorofila *a* en células de *Gymnodinium linucheae*.

Muestra	Clorofila <i>a</i> (mg)	%
Células crudas ^a	14.81	100
50% Sulfato amonio ^b	3.34	22.56
100% Sulfato amonio ^b	1.59	10.72
Sephadex-G200 ^b	0.51	3.47
Columna Q2 Pico 1 ^b	0.16	1.08
Columna Q2 Pico 2 ^b	0.14	0.95

El primer paso en la purificación del complejo proteína-pigmento fue el rompimiento celular durante el cual los 50 mL de células se rompieron utilizando una Prensa de French. El lisado fue centrifugado para separar las células que no fueron rotas y desechos celulares. El sobrenadante resultado de 3 centrifugaciones (151mL), se trató con 50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lo que sirvió para precipitar las proteínas de las membranas celulares; esta fracción corresponde

al 22.56% de la muestra inicial de clorofila *a* (Cuadro 1). El PCP crudo (143 mL) se trató con 100% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ teniendo como resultado la precipitación del PCP en una pastilla, la cual se resuspendió en 18 mL de amortiguador TM. Esta fracción representa el 10.7% de la cantidad inicial de clorofila *a* con que se empezó a purificar el complejo proteína-pigmento (Cuadro 1). Los 18 mL de extracto se dializaron en amortiguador TMS frío y se concentraron en una cama de polietilén glicol obteniendo 8 mL de extracto. Muestras de 1 mL se separaron por peso molecular con una columna Sephadex G-200 (Figura 3) obteniendo un pico.

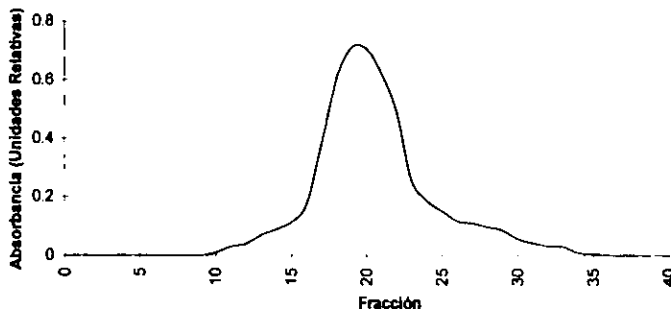


Figura 3.- Perfil de elución de PCP de *G. linucheae* de una columna de filtración Sephadex G-200 eluido con TMS 100mM Tris-HCl, pH 8.0; 2mM Mg Cl₂; 2mM NaEDTA; 500mM NaCl. Absorbancia en el UV 280 nm (—).

La fracción de PCP obtenida en G-200 representa el 3.47% de la muestra inicial (Cuadro 1), el extracto se dializó contra un amortiguador TM y se pasó por una columna de desalinización Sephadex G-25 eluida con el amortiguador TM. Como último paso de purificación, el extracto de PCP se inyectó en una columna de Intercambio aniónico Q₂, obteniéndose del extracto dos fracciones (Figura 4a), donde la fracción 1 no mostró afinidad hacia la columna y por lo tanto no fue adsorbida en ésta (Figura 4), mientras que la fracción 2 fue adsorbida a la matriz eluyéndose con un gradiente lineal de 0.0 a 0.2 M de NaCl

(Figura 4). Las dos fracciones diferentes de PCP presentaron la misma abundancia relativa, donde la fracción 1 corresponde al 1.08% de la cantidad de clorofila *a* con la que se inició el proceso, y la fracción 2 representa el 0.95% de la muestra inicial (Cuadro 1). La fracción 1 se volvió a inyectar a la columna Q₂ obteniendo solamente la fracción 1 (Figura 4b), de igual forma se hizo con la fracción 2 obteniendo en el perfil de elución solamente la fracción 2 (Figura 4c), esto se hizo para verificar la existencia de las dos fracciones o formas diferentes de PCP descartando así que una de las dos fracciones fuese producto de degradación de la otra.

Del análisis electroforético de una fracción de cada estado de purificación del extracto se demostró que las células lisadas (Figura 5 carril A) mostraron la banda correspondiente a la apoproteína de 35 KDa además de varias proteínas presentes. Las fracciones precipitadas con sulfato de amonio al 50 y 100% de saturación (Figura 5 carril B, C) contenían un menor número relativo de polipéptidos en la muestra a diferencia de las células lisadas (carril A); éste patrón se presentó después de haber filtrado el extracto en la columna G-200 (Figura 5 carril D). Todas las muestras en los diferentes estados de purificación mostraron una apoproteína monomérica de 35 KDa aproximadamente, correspondientes al PCP.

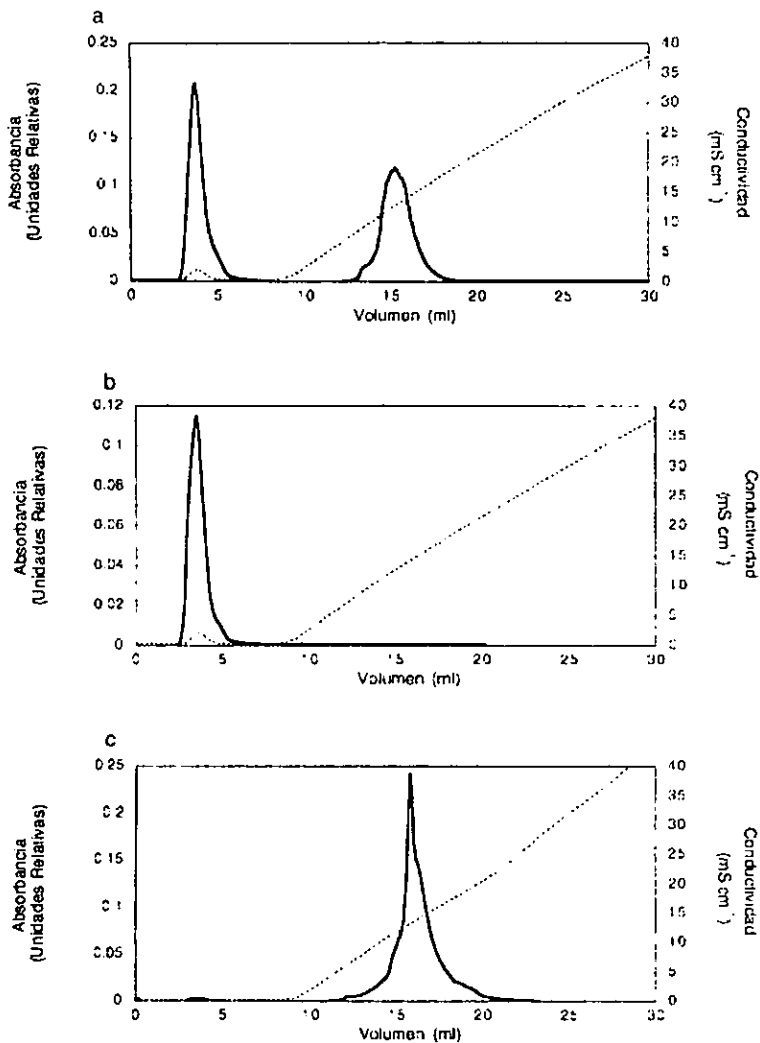


Figura 4.- Perfiles de elución de las diferentes fracciones de PCP separadas mediante el empleo de una columna de Intercambio aniónico Q₂ Bio-Rad, equilibrada con amortiguador Tris 1mM-HCl, pH 8.0, eluida con un gradiente lineal de NaCl de 0-0.2M. Conductividad de NaCl ----, absorbancia a 280 nm — (a) fracciones 1 y 2 (b) perfil de elución de la fracción 1 (c) perfil de la fracción 2.

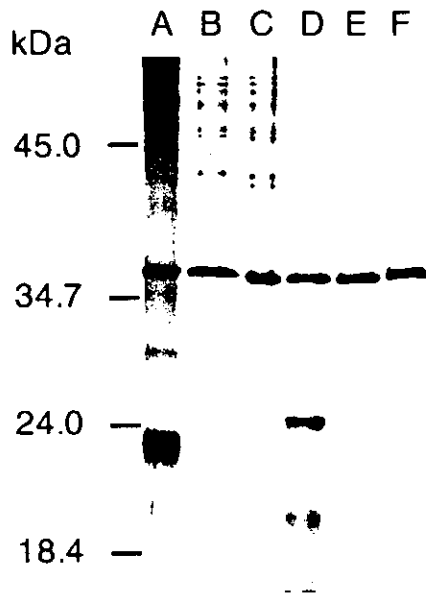
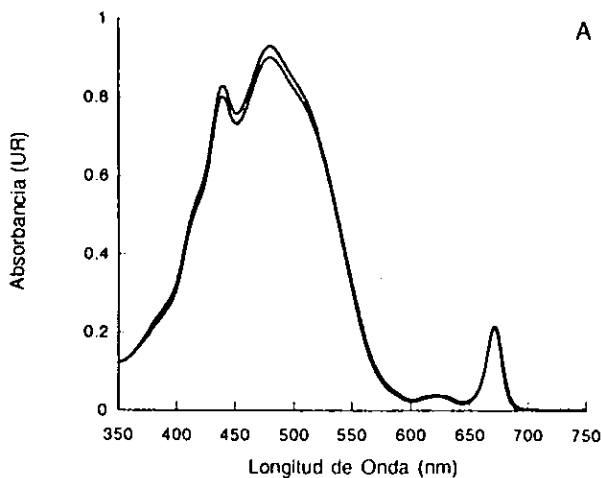


Figura 5.- Electroforésis en gel de poliacrilamida-SDS. Patrón de purificación de PCP aislado de *Gymnodinium linucheae*. Carril (A) células lisadas; carril (B y C) fracciones tratadas con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50% y 100% de saturación respectivamente; carril (D) PCP eluido de una columna Sephadex G-200; carril (E y F) fracción 1 y fracción 2 de PCP resultado de la columna Q_2 de Intercambio aniónico. Cada línea contiene 30 ng de clorofila a. Las bandas de proteínas fueron visualizadas por tinción de plata.

Las dos fracciones separadas por la columna de intercambio aniónico Q₂ se caracterizaron espectroscópicamente. Se realizaron espectros de absorción ya que consistente con observaciones previas en diferentes especies de dinoflagelados, la absorbancia y emisión máxima del PCP dependen de la estructura cuaternaria de la holoproteína que la conforma, por lo que las características espectrales del PCP de *G. linucheae* (Figura 6A), mostraron un amplio rango de absorción dentro de la zona azul-verde del espectro de luz visible con la presencia de dos picos máximos de absorción en la región del azul (435 nm y 480 nm), los cuales corresponden a la molécula de clorofila *a* y peridina respectivamente estando exenta la muestra de clorofila *c*₂ como se esperaba. Los espectros de absorción del PCP de cada una de las fracciones obtenidas fueron normalizados al pico de absorción máxima de la clorofila *a* en la zona del rojo del espectro a 670 nm. El espectro de diferencia de absorbancia de la fracción 2 menos la fracción 1 de PCP, (Figura 6B) mostró que el arreglo de los pigmentos en la holoproteína es diferente en cada una de las fracciones lo que provoca un corrimiento en la región roja del espectro.



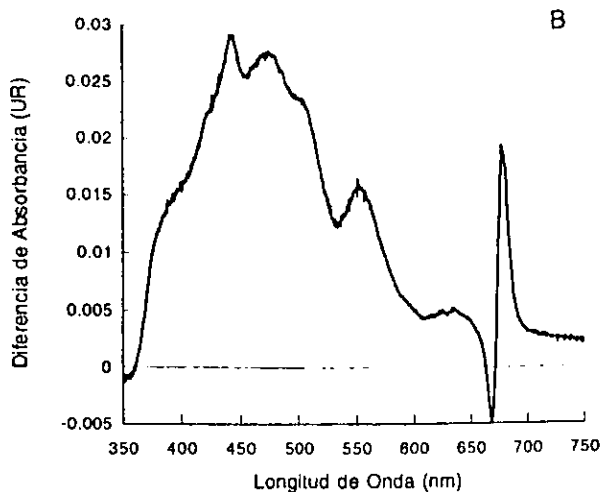


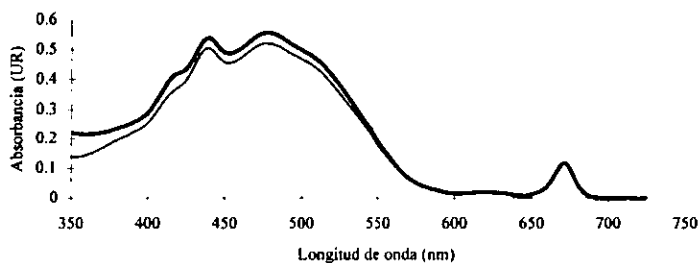
Figura 6. - A) Espectro de absorción de PCP de dos fracciones aisladas de *Gymnodinium linucheae* separados por cromatografía de Intercambio aniónico Q2, espectro normalizado al pico de absorción máxima de clorofila *a*. B) Espectro de diferencia de las dos fracciones del complejo PCP. (Datos agosto de 1998).

El análisis de absorbancia bajo el pico correspondiente a la peridina a 478 nm para la fracción 1 relativo a la fracción 2 fue de 0.93 después de haber normalizado los espectros con respecto al pico en el rojo de la clorofila *a* (Figura 7A), existiendo una peridina de diferencia entre las dos fracciones, ya que las características ópticas de cada fracción son resultado de la estructura y composición de la holoproteína. Es importante mencionar que la mezcla que contenía las dos fracciones mostró principios de desnaturalización, lo cual se notó en el espectro de absorción de la muestra (Figura 7A). Esto se debe a que el magnesio de la clorofila *a* se pierde quedando la feofitina como producto de degradación absorbiendo energía en la región azul del espectro; éste proceso ocurre debido a que la clorofila *a* es una molécula fotolábil.

El espectro de diferencia de absorbancia de la fracción 2 menos la fracción 1 de PCP (Figura 7B) mostró que el arreglo de los pigmentos de la holoproteína

es diferente en cada una de las dos fracciones, además de que presenta un pico a 417 nm correspondiente a la feofitina y otro pico a 478 nm de la peridina, además de que existen otros elementos que absorben en el ultravioleta.

A



B

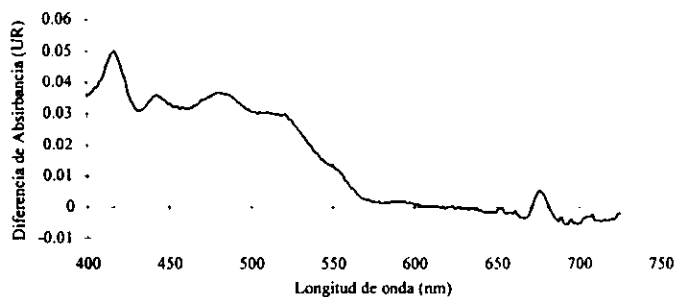
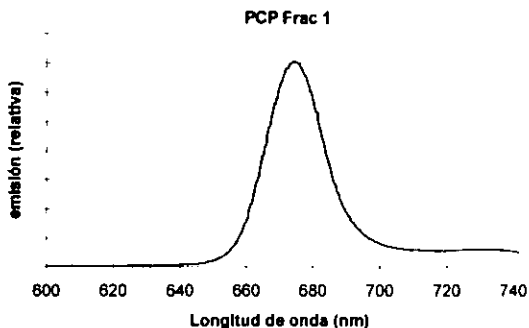


Fig 7.- A) Espectro de absorción de dos fracciones de PCP aisladas de *Gymnodinium linucheae* separadas por cromatografía de intercambio aniónico Q₂, espectro normalizado al pico de absorción máxima de clorofila *a*. B) Espectro de diferencia de las dos fracciones del complejo PCP. Datos de Diciembre 1998.

Sobre la excitación preferencial de la peridina a 480 nm, la fluorescencia de la clorofila *a* se observó con un pico máximo de emisión a 674.4 nm la

fracción 1 (figura 8A) a diferencia de la fracción 2 con un pico a 676.1 nm (figura 8B), lo que indica una eficiente transferencia de energía de la molécula de peridinina a la clorofila *a* (figura 8). Este resultado demuestra una heterogeneidad en los componentes espectrales para la clorofila *a* y la peridinina en el PCP.

A



B

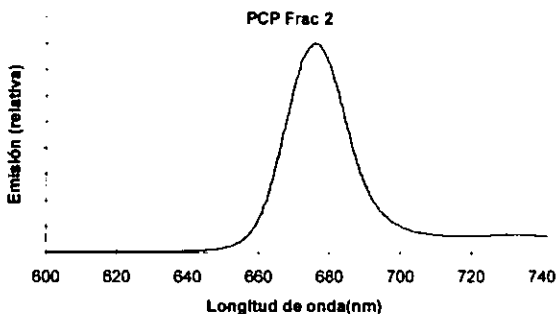
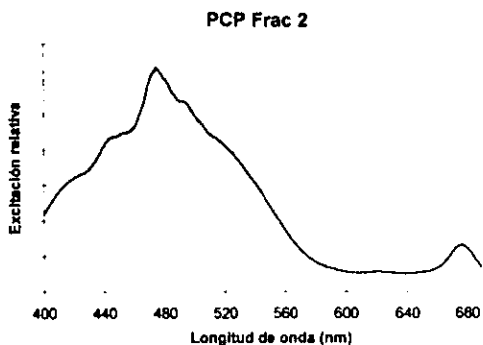


Figura 8.- Espectro de emisión de fluorescencia de PCP aislado de *Gymnodinium linucheae* por FPLC: (a) fracción baja en sal, (b) fracción alta en sal. Moléculas excitadas a una longitud de onda de 480 nm. Los espectros no están corregidos. Los espectros se hicieron en un espectrofluorómetro SLM Instruments, conectado a una computadora con sistema SABLE digitalizando los espectros. Se usó una configuración para capturar 640 puntos por espectro utilizando un intervalo de 0.25 nm .

El espectro de excitación (Figura 9) muestra las propiedades ópticas del PCP absorbiendo principalmente en el rango de los 470 nm a 550 nm correspondiente a la molécula de peridínina y en la región del rojo del espectro de luz visible. Esta última región corresponde al segundo pico máximo de absorción de la molécula de clorofila *a*. Los espectros de excitación no fueron corregidos por la variación de energía de excitación que la lámpara emite para cada longitud de onda.

A



B

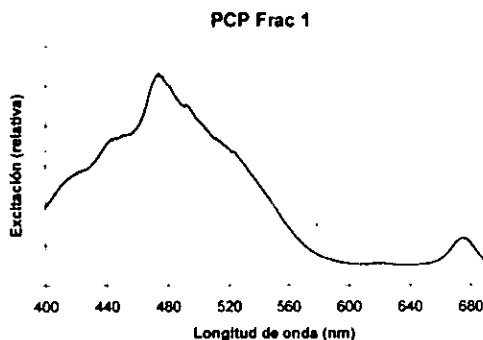
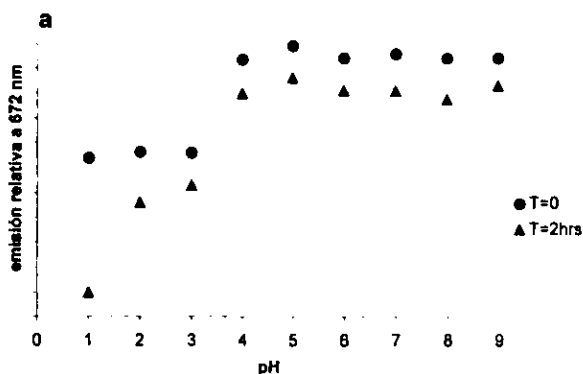


Figura 9.- Espectro de excitación de fluorescencia del complejo PCP aislado del dinoflagelado simbiote *Gymnodinium linucheae* (a) fracción baja en sal (fracción 1); (b) fracción alta en sal (fracción 2). Espectros no corregidos.

Las dos fracciones de PCP se utilizaron como un sistema de estudio para documentar las variaciones en la cosecha cuántica de la fluorescencia *in vitro* en función del pH de la solución en la que se diluyeron las dos holoproteínas obtenidas. Las soluciones en que se colocaron muestras de la fracción 1 así como de la fracción 2 tenían pH desde 1 a 9. La medición de la fluorescencia en el pico de la clorofila *a* (672 nm) y la cuantificación de los cambios en la emisión de fluorescencia con respecto al pH, demostraron insensibilidad al cambio de pH (Figura 10), aunque en su cosecha cuántica hubo diferencias entre las fracciones, donde la fracción 2 fue la que siempre presentó valores mayores. Al cabo de dos horas de incubación de las muestras en estas condiciones de pH, se observaron diferencias en la emisión de fluorescencia de las soluciones con pH al que cada una de las fracciones se desnaturizó (Figura 10). Los cromóforos de la fracción 1 perdieron coloración a pH de 1, 2 y 3, así al cabo de 2 horas en estas condiciones se desnaturizó la proteína. Sin embargo, a pH mayores de 4 presentó fluorescencia constante sin desnaturización (Figura 10a). Por otro lado, la fracción 2 presentó una baja de fluorescencia a pH 1 y al cabo de dos horas perdió coloración y se desnaturizó a diferencia de las muestras expuestas a pH mayores a 2 donde los valores fluctuaron hasta mantenerse sin cambios en su fluorescencia (Figura 10b). Por lo anterior, los espectros de emisión de las 2 holoproteínas de PCP intactas, no presentaron evidencias que indiquen que el PCP es sensible a los cambios de pH.



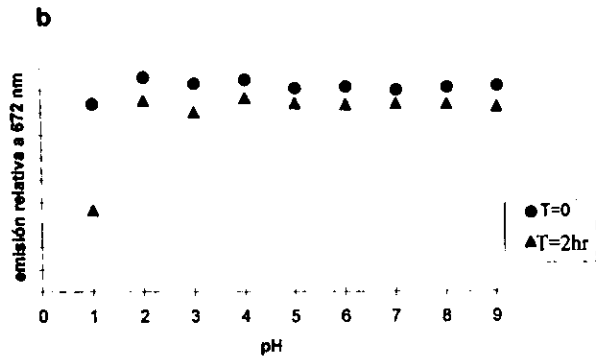


Figura 10.- Emisión de la fluorescencia a 672 nm de las holoproteínas de PCP en soluciones a diferentes pH (de 1 a 9) excitando el complejo colector de luz a una longitud de onda de 480 nm. a) fracción baja en sal (fracción 1y b) fracción alta en sal (fracción 2).

DISCUSIÓN

El haber tratado las células simbiotes con sulfato de amonio al 50% de saturación fue de utilidad para precipitar las proteínas de las membranas celulares y una vez obtenido un sobrenadante color marrón se saturó con 100% de sulfato de amonio precipitando el PCP. El extracto de PCP obtenido se filtró utilizando una columna Sephadex G-200; esta separación sirvió para describir si existían dos o más fracciones de acuerdo a su peso molecular; considerando los resultados reportados por Haxo *et al.* (1976) quienes obtuvieron 3 fracciones diferentes usando una columna Sephadex G-100, o los reportados por Ogata *et al.* (1994) que al purificar utilizando Sephadex G-100 encontraron una forma asociada de PCP en el volumen vacío de la columna. En la columna G-200 no se obtuvo más que un pico (Figura 3). Esto se pudo deber a que en este protocolo de purificación, se realizaron cortes con sulfato de amonio por lo que posiblemente ahí se haya precipitado el elemento que correspondía a la fracción que Haxo *et al.* (1976) mencionó como un primer pico color naranja, el cual no fue caracterizado con detalle, seguido del pico correspondiente al PCP, un tercer pico correspondiente al citocromo f (Haxo *et al.* 1976).

Una vez obtenido un solo pico de la columna Sephadex G-200 se utilizó cromatografía de intercambio aniónico Q₂ Bio-Rad, logrando fraccionar el extracto de PCP en dos fracciones, las cuales se analizaron espectroscópicamente. El patrón de elución obtenido de la columna Q₂ demostró la existencia de dos fracciones distintas (Figura 4), las cuales no forman productos de degradación de una sola forma como lo postula Ogata *et al.* (1994) quienes separan varias formas de PCP como producto de la

degradación parcial del PCP, lo cual fue comprobado ya que al utilizar un inhibidor de proteasas se obtuvo una sola isoforma. Datos experimentales de Sharples *et al.* (1996) apoyan la existencia de diferentes fracciones de PCP, quienes obtuvieron una fracción principal baja en sal y una fracción alta en sal. Estas fracciones fueron separadas utilizando cortes con sulfato de amonio y una columna de intercambio iónico además de que realizaron un análisis obteniendo la secuencia de las proteínas de cada tipo de PCP, las cuales resultaron ser diferentes en su estructura primaria. Así, el análisis de ADN y la secuenciación de la proteína apoyan la existencia de isoformas de PCP, además de que esta secuencia puede ser una evidencia sobre la localización del PCP dentro del aparato fotosintético.

Muestras de las dos fracciones, resultado de la separación por intercambio aniónico, junto con muestras de cada estado de purificación se analizaron por medio de la electroforesis (Figura 5) comprobando así que durante el proceso de purificación realmente se estaban eliminando proteínas que no eran el punto de interés de este trabajo, además se determinó que se trataba de apoteínas monoméricas cuyo peso molecular fue de 35 KDa aproximadamente.

El análisis espectroscópico del PCP, aislado del dinoflagelados simbiote *Gymnodinium linucheae* y separado por FPLC, indicó que los cromóforos de las fracciones tuvieron estequiometrías diferentes (Figura 6) aun cuando las dos fracciones presentaron la misma abundancia. Las características espectroscópicas y composición en apoproteínas de este complejo antena mostraron un amplio rango de absorción en el espectro de luz visible, además de presentar propiedades distintivas de absorción asociadas con los cromóforos

peridininina y clorofila *a* (Figura 6A). El análisis de la absorbancia bajo el pico correspondiente a las moléculas de peridininina a 478 nm para ambas fracciones fue de 0.93 (fracción 1/fracción 2) después de normalizar los datos con respecto al pico de la clorofila *a*, demostrando la existencia de una molécula de peridininina de diferencia entre las dos fracciones, la cual se ve claramente en el espectro de diferencia de absorbancia de las fracciones (Figura 6B). Esto coincide con los datos reportados por Iglesias-Prieto (1996) quien, trabajando con PCP de *S. californium* separó por cromatografía de intercambio iónico dos fracciones las cuales tuvieron la misma abundancia, y una de las fracciones tuvo mas cantidad de peridininina.

Se ha demostrado que diferentes Isoformas de PCP son expresadas de manera diferencial dependiendo de las condiciones de luz (Iglesias-Prieto y Trench 1997). Los análisis de PCP, aislados de dinoflagelados cultivados en diferentes regímenes luminosos (alta luz y baja luz), indicaron que la forma monomérica de PCP es más abundante en cultivos de alta luz, mientras que la forma dimérica en baja luz por lo que en este caso hubo una expresión diferencial del componente dependiente de la luz, quedando abierta la pregunta del significado funcional de la expresión diferencial de PCP monomérico o dimérico. Durante el proceso de foto-aclimatación hay cambios en la concentración celular de pigmentos fotosintéticos relacionados con la expresión diferencial de ciertas proteínas que se unen a la clorofila formando, así el tipo, abundancia del complejo, la pigmentación y la composición de los polipéptidos es resultado de la foto-aclimatación de los organismos (Boczar y Prézelin 1987). La existencia de una fracción enriquecida en peridininina pudiera ser una

respuesta de foto-aclimatación protegiendo la maquinaria fotosintética del exceso de luz. Además, los productores primarios bajo condiciones de luz saturantes, evocan vías no-fotoquímicas para la desactivación del exceso de excitación potencialmente dañino.

Durante el proceso de aislamiento, las muestras se trabajaron a baja luz evitando una fotodestrucción de los pigmentos. Se realizaron análisis espectroscópicos de las muestras en agosto y cuatro meses después (Figura 6 y 7, respectivamente). Los espectros de absorción de las muestras guardadas durante cuatro meses presentaron fotodestrucción de la molécula de clorofila *a*, la cual al perder el magnesio quedó como feofitina (Figura 7A).

El espectro de diferencia de absorbancia de las dos fracciones de PCP (Figura 6B) mostró un pico en la región de los 350-400 nm por lo que existen otras proteínas presentes absorbiendo en la región del ultravioleta, demostrando así que las muestras no llegaron a ser totalmente homogéneas. Las muestras que estuvieron en refrigeración (Figura 7B), presentaron en su espectro de diferencia un pico correspondiente a la feofitina resultado de fotodescomposición de la muestra.

El complejo PCP, se postulaba está localizado en el lado estromal de la membrana tilacoidal en asociación con otros componentes del aparato fotosintético, por analogía a las ficobiliproteínas (Prézelin 1987). En realidad no se sabe todavía con seguridad en que parte de la membrana tilacoidal se encuentra este complejo, aunque evidencias derivadas del análisis de secuencias de aminoácidos indican que el PCP se localiza en el lado luminal de la membrana tilacoidal (Sharples *et al*, 1996). Con la finalidad de tener pruebas de la localización del PCP, se han tratado de marcar tilacoides de *Amphidinium*

carterae usando técnicas de Inmuno-oro, trabajos que no han sido concluidos por Vesik y Hiller.

Con el propósito de investigar los mecanismos bioquímicos de la desactivación no-fotoquímica regulada por el pH, se manipuló el ambiente que rodea al PCP en el ámbito de pH registrando los cambios en la cosecha cuántica de la fluorescencia. Los resultados de emisión de fluorescencia demostraron la existencia de diferencias estructurales y espectrales entre las dos formas obtenidas de PCP, teniendo cada muestra valores diferentes de cosecha cuántica 20.887 UR para la fracción 1 y 23.748 UR para la fracción 2. Además, cada muestra tuvo valores de pH diferentes para su desnaturalización (Figura 10). La insensibilidad al pH es debida probablemente a que se trabajó con monómeros, los cuales no se mantuvieron en interacción para estar como estructuras trimericas, y esto posiblemente provocó que algunos aminoácidos de la cavidad hidrofóbica de la proteína perdieran su habilidad de mantenerse en contacto y perder su estructura como lo mencionan Kühlbrandt y Wang (1991). Esto implica la necesidad de tomar en cuenta la estructura trimérica en investigaciones posteriores para estudiar cambios existentes en el ámbito de fluorescencia al ser expuestas las muestras a ambientes con diferentes pH como se había postulado. El interés es debido a que cuando la fotosíntesis es saturada por exceso de luz, las plantas pueden disipar el exceso de energía como calor siendo éste un proceso de foto-protección. En hojas de plantas superiores se relaciona la desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia con la acidificación del lumen tilacoidal resultado del transporte de electrones, este cambio en el pH provoca la protonación de algún aminoácido de la proteína del

complejo colector de luz LHCII controlando así las interacciones entre los pigmentos en este caso en particular la asociación de las xantofilas y clorofilas provocando la disipación del exceso de energía (Ruban y Horton 1994). Existen varios factores que determinan la capacidad de desactivación; entre los cuales el contenido de xantofilas unidas al complejo colector de luz de plantas superiores.

El PCP es un complejo colector de dinoflagelados que se postula esta en el lumen del tilacoide. La estructura y función de las clorofilas y proteínas en los sitios de disipación de energía, según el modelo de Ruban y Horton 1994, están reguladas por cambios en la estructura terciaria de la proteína por la protonación de algún aminoácido dependiente del pH modulando la transferencia de energía entre las clorofilas y el caroteno (Horton *et al*, 1994) (Figura 2B). En el caso del PCP se trata de clorofilas y peridíninas.

Siendo el PCP una molécula estable para ser analizada ópticamente además de conocerse su estructura (Hofmann *et al*. 1996), el PCP de *Gymnodinium linucheae* se tomó como modelo para estudiar el mecanismo bioquímico para la desactivación no-fotoquímica dependiente de la energía. Al ser expuestas las muestras a diferentes pH se registraron cambios en el ámbito de la fluorescencia de manera diferente para cada una de las dos fracciones pero este proceso no resultó ser reversible como se esperaba y en algunos casos la muestra llegó a desnaturalizarse, por lo que no se pudo comprobar que un cambio en la conformación de la proteína, debida al pH, desencadenará el

cambio estructural demostrando que el complejo PCP se encuentra localizado en el lumen del tilacoide.

Quedan muchas preguntas abiertas acerca de la estructura del PCP. Por ejemplo: ¿por qué es un complejo soluble en agua?, ¿Cómo realiza la transferencia de energía a la membrana tilacoidal?, ¿En qué parte del aparato fotosintético se localiza? , y, ¿por qué la peridínina es única de dinoflagelados teniendo carotenoides análogos en algunas divisiones algales?. Las respuestas correspondientes ayudarían a aclarar muchos aspectos bioquímicos para el funcionamiento del PCP.

ABREVIATURAS

PCP, complejo proteína-peridininina-clorofila *a*.

acPC, complejo proteína-clorofilas *a/c*-peridininina.

KDa, kilodalton.

IEF, electroforésis de enfoque isoelectrico.

DNA, ácido desoxirribonucleico.

LHCII, complejo colector de luz.

qN, desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia.

ATP, adenosintrifosfato.

qE, desactivación no-fotoquímica de la fluorescencia dependiente de la energía.

C-C, enlaces carbono-carbono.

PSII, fotosistema II.

Chl, clorofila.

g, gravedades.

Pa, pascal.

qy, cosecha cuántica de la fluorescencia.

UR, unidades relativas de absorbancia.

REFERENCIAS

- Andersen, B., Koch, B. and Scheller, H.V. (1992) Structural and functional analysis of the reducing side of photosystem II. *Journal of Physiology. Plant.* **84**:154-161.
- Barrett, J. y Anderson, J.M. (1980) The P700-chlorophyll *a*-protein complex and two major light-harvesting complexes of *Acropora paniculata* and other brown seaweeds. *Biochim. Biophys. Acta.* **590**:309-323.
- Boczar, B.A. y Prézelin, B.B. (1987) Chlorophyll-protein complexes from the red-tide dinoflagellate *Gonyaulax polyedra* Stein. *Plant Physiol.* **83**:805-812.
- Chang, S.S. y Trench, R.K. (1982) Peridinin-chlorophyll *a*-proteins from the symbiotic dinoflagellates *Symbiodinium microadriaticum*. Freudenthal. *Proc R. Soc. Lond.* **215**:191-210.
- Chang, S.S. y Trench, R.K. (1984) The isoelectric forms, quaternary structure and amino acid composition of peridin-chlorophyll *a*- proteins from the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. Freudenthal. *Proc R. Soc. Lond. B.* **222**:259-271.
- Demming-Adams, B. (1990) Carotenoids and photoprotection: a role for the xanthophyll zeaxanthin. *Biochem. Biophys. Acta.* **1020**: 1-24.
- Demming-Adams y Adams, B and W.W. (1992) Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**:599-626.
- Demming, B., Winter, K., Kruger, A. And Czygan, F. (1987) Photoinhibition and zeaxanthin formation intact leaves. A possible role of role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy. *Plant. Physiol.* **84**:218-224.
- French, C.S., J.S. Brown y M.C. Lawrence. (1972) Four Universal Forms of Chlorophyll *a*. *Plant. Physiol.* **49**:421-429.
- Govind, N.S., Roman, S.J., Iglesias-Prieto, R., Trench, R.K. (1990) An analysis of the light-harvesting peridinin-chlorophyll *a*-proteins from dinoflagellates by immunoblotting techniques. *Proc. R. Soc. Lond. B* **240**:187-195.
- Govindjee., Wong D., Prézelin, B.B., Sweeney, B.M. (1979) Chlorophyll *a* fluorescence of *Gonyaulax polyedra* grown on a light-dark cycle and after transfer to constant light. *Photochem. Photobiol.* **30**:405-411.
- Gregory, R.P.F (1989) The capture of light energy by living organisms. In: *Photosynthesis* (Edited by R.P.F. Gregory) USA. Chapman y Hall. New York pp 1-11.
- Haidak, D.J., Mathews, C.K. and Sweeney, B.M. (1966) Pigment protein complex from *Science.* **152**:212-213.

- Hall, D.O. y Rao, K.K. (1994) *Photosynthesis*. 5ª edición. pp 58-61.
- Haxo, F.T., Kycia, J.H., Somers, G.F., Bennett, A. y Siegelman, H.W. (1976) Peridinin-chlorophyll *a* proteins of the dinoflagellates *Amphidinium carterae* (Plymouth 450). *Plant Physiol.* **57**:297-303.
- Hiller, R.G., Wrench, P.M., Gooley, A.P., Shoebridge, G., Breton, J. (1993) The major intrinsic light-harvesting protein of *Amphidinium*: Characterization and relation to other light-harvesting proteins. *Photochem. Photobiol.* **57**:125-131.
- Hiller, R.G., Wrench, P.M., Sharples, F.P. (1995) The light-harvesting chlorophyll *a-c* binding protein of dinoflagellates: a putative polypeptide. *FEBS Lett.* **363**:175-178.
- Hofmann, E., Pamela, W.M., Frank, P.S., Hiller, R.G., Wolfram, W., Kay, Diederichs. (1996) Structural Basis of Light Harvesting by Carotenoids: Peridinin-Chlorophyll-Protein from *Amphidinium carterae*. *Science*. **272**:1788-1791.
- Horton, P., Ruban, A.V. (1994) The role of light-harvesting complex II in energy quenching In: *Photoinhibition of Photosynthesis*. (Edited by N.R. Baker and J.R. Bowyer.) Bios Scientific Publisher, Oxford, United Kingdom. pp 111-128.
- Horton, P., Ruban, A.V., Walter, R.G. (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu.Rev.Plant. Physiology.* **47**:655-684.
- Iglesias-Prieto, R., Govind, N.S. y Trench, R.K. (1991) Apoprotein composition and spectroscopic characterization of the water-soluble peridinin-chlorophyll *a*- proteins from the symbiotic dinoflagellates. *Proc. R. Soc. Lond. B* **246**:275-283.
- Iglesias-Prieto, R., Matta, J.M., Robins, W.A., y Trench, R.K. (1992) Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:10302-10305.
- Iglesias-Prieto, R., Govind, N.S. y Trench, R.K. (1993) Isolation and characterization of three membrane bound chlorophyll-protein complexes from four dinoflagellate species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **340**:381-392.
- Iglesias-Prieto, R. y Trench, R.K. (1994) Acclimatation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. I. Responses of the photosynthetic unit to changes in photon flux density. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **113**: 163-175.
- Iglesias-Prieto, R. (1995) The effects of elevated temperature on the photosynthetic responses of symbiotic dinoflagellates. In: P. Mathis (ed). *current research in photosynthesis*. Kluwer. Academic Publishers. Dordrecht.
- Iglesias-Prieto, R. y Trench, R.K. (1996) Spectroscopic Properties of Chlorophyll *a* in the Water-Soluble Peridinin-Chlorophyll *a*-Protein Complexes (sPCP) from the Symbiotic Dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum*. *J. Plant. Physiol.* **149**:510-516.

Iglesia-Prieto, R. (1996) Biochemical and Spectroscopic properties of the light-harvesting apparatus of dinoflagellates. B.R.Chaudhary (ed). Genetics and Molecular Biology of Algae. Academic Publishers, Amsterdam. pp. 301-322.

Iglesias-Prieto, R. y Trench, R.K. (1997a) Acclimation and adaptation to irradiance in symbiotic dinoflagellates. II. Responses of chlorophyll protein complexes to different light regimes. *Marine Biology*. **130**:23-33.

Jefrey, S.W., Sielicki, and G.Humphrey. (1975) New spectroscopic equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁, *c*₂ in algae, phytoplankton, and higher plants. *Biochem. Physiol.* **167**:191-194.

Jovine, R.V.M., Triplett, E.L., Nelson, N.B y Prézelin, B.B. (1992) Quantification of Chromophore Pigments, Apoprotein Abundance and Isoelectric Variants of peridinin-Chlorophyll *a*-Protein Complexes (PCPs) in the Dinoflagellates *Heterocapsa pygmaea* Grown under Variable Light Conditions. *Plant Cell Physiol.* **33**:733-741.

Koka, P. y Song, P. (1977) The chromophore topography and binding environment of peridinin-chlorophyll *a*-protein complexes from marine dinoflagellate algae. *Biochim. Biophys. Acta.* **495**:220-231.

Krause, G.H., Laasch, H and Weis, E. (1988) Regulation of thermal dissipation of absorbed light energy in chloroplasts indicated by energy-dependent fluorescence quenching. *Plant. Physiol. Biochem.* **26**:445-452.

Krause, G.H., Behrend, U. (1986) Δ pH-dependent chlorophyll fluorescence quenching indicates a mechanism of protection against photoinhibition of chloroplasts. *FEBS Lett* **200**:298-302.

Kroon, B., Prézelin, B.B y Schofield, O. (1993) Chromatic regulation of quantum yield for Photosystem II charge separation, oxygen evolution and carbon fixation in *Heterocapsa pygmaea*. *J. Phycology.* **29**:453-462.

Kühlbrandt, W., y Wang, D.N. (1991) Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electronic crystallography. *Nature.* **350**:130-134.

Kursar, T.A., Alberte, R.S. (1983) Photosynthetic unit organization in a red algae. Relationships between light-harvesting pigments and reaction centers. *Plant. Physiol.* **72**:409-4414.

Larkum, A.W.D and Barret, J. (1983) Light harvesting systems in algae, *Adv. Bot. Res.* **10**:3-189.

Lee, A.I.-C., Thornber, P.J. (1995) Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*). The xanthophyll cycle intermediates occur mainly in the light-harvesting complexes of photosystem I and photosystem II. *Plant. Physiol.* **107**:565-574.

Markwell, J.P., Thornbert, J.P., Boggs, R.T. (1979) Higher plant chloroplasts: evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:1233-1235.

Norris, B.J. and Miller, D.J. (1994) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the precursor of the peridinin-chlorophyll *a*-binding protein from the dinoflagellate *Symbiodinium* sp. *Plant. Mol. Biol.* **24**:673-677.

Ogata, T. y Kodama, M. (1993) Peridinin-chlorophyll *a*-proteins of toxic dinoflagellates. In: Toxic phytoplankton blooms in the sea. T.J Smayda and Y. Shimizu (eds). Pp. 901-905. Elsevier Science Publishers B.V, New York.

Ogata, T., Kodama, M., Kobayashi, M., Nozawa, T., Katoh, T y Mimuro, M. (1994). A novel peridinin-chlorophyll *a* protein (PCP) from the marine dinoflagellate *Alexandrium cohorticula*: a high pigment content and plural spectral forms of peridinin and chlorophyll *a*. *FEBS Letters.* **356**:367-371.

Olaizola, M. and Yamamoto, H.Y. (1994) Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* **30**:606-612.

Owens, T.G., Alberte, R.S. and Gallagher, J.C. (1987) Photosynthetic light-harvesting function of violaxanthin in *Nannochloropsis* spp. (Eustigmatophyceae). *J. Phycol.* **23**:79-85.

Owens, T.G. (1988) Light harvesting antenna systems in the chlorophyll *a/c*-containing algae. In: *Light-energy Transduction in Photosynthesis: Higher Plant and Bacterial Models* (eds S.E. Stevens and D.A. Bryant). American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp, 122-136.

Owens, T.G. (1994) Excitation energy transfer between chlorophylls and carotenoids. A proposed molecular mechanism for non-photochemical quenching In: *Photoinhibition of Photosynthesis*. (Edited by N.R. Bajer y J.R. Bowyer). Bios Scientific Publisher Oxford United Kingdom. pp 95-109.

Peter, G.F. and Thornber, J.P. (1991) Biochemical composition and organization of higher plant photosystem II light-harvesting pigment proteins. *J. Biol. Chem.* **226**:16745-16754.

Prézellin, B.B. y Haxo. (1976) Purification and characterization of peridinin-chlorophyll *a*-proteins from the marine dinoflagellate *Glenodinium* sp. and *Gonyaulax polyedra*. *Planta.* **128**:133-141.

Prézellin, B.B. (1976) The role of peridinin-chlorophyll *a*-proteins in the photosynthetic light adaption of the marine dinoflagellates *Glenodinium* sp. *Planta.* **130**:225-233.

Prézellin, B.B., Alberte, R.S. (1978) Photosynthetic characteristics and organization of chlorophyll in marine dinoflagellates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**:1801-1804.

Prézélin, B.B. (1981) Light Reactions in Photosynthesis. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquatic Sciences*. **210**:1-42.

Prézélin, B.B. (1987) Photosynthetic physiology of dinoflagellates. In: F.J.R. Taylor (ed). *The biology of dinoflagellates*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. **21**:174-223.

Roman, S.J., Govind, N.S., Triplett, E. L. y Prézélin, B.B. (1988) Light regulation of peridinin-chlorophyll *a*-protein (PCP) complexes in the dinoflagellate *Glenodinium* sp. *Plant. Physiology*. **88**:594-599.

Ruban, A.V., Young, A.J y Peter, H. (1993) Induction of Non-Photochemical Energy Dissipation and Absorbance changes. In *Leaves. Plant Physiology*. **102**:741-750.

Ruban, A.V., Young, A.J., Pascal, A.A and Horton P. (1994) The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant. Physiol.* **104**:227-234.

Ruban, A.V., Peter, H. (1995) Regulation of Non-Photochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence. In *Plants. Aus. J. Plant. Physiol.* **22**:221-230.

Sharples, F.P., Wrench, P.M., Ou, K y Hiller, R.G. (1996) Two distinct forms of the peridinin-chlorophyll *a* protein from *Amphidinium carterae*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1276**:117-123.

Shiozawa, J.A., Alberte, R.S. y Thornber, P.J. (1974) The P700-chlorophyll *a*-protein: Isolation and some characteristics of the complex in higher plants. *Arch. Biochem. Biophys.* **165**:388-396.

Siegelman, H., Kycia, J.H. y Haxo, F.T. (1977) Peridinin-chlorophyll *a*-protein of dinoflagellate algae. *Brookhaven. Symp. Biol.* **28**:162-169.

Song, P.S., Koka, P., B.B. Prézélin and Haxo, F.T.(1976) Molecular topology of the photosynthetic light-harvesting pigment complex, peridinin-chlorophyll *a*-protein, from dinoflagellates. *Biochemistry* **15**: 4422-4427.

Steck, K., Wacker. T., Welte, W., Sharples, F.P. y Hiller, R.G. (1990) Crystallization and preliminary X-ray analysis of a peridinin-chlorophyll *a*-protein from *Amphidinium carterae*. *FEBS Lett.* **268**:48-50.

Taylor, F.J.R. (1987) General group characteristics. Special features of interest: Short history of dinoflagellate study. In: F.J.R. Taylor (ed.). *The biology of dinoflagellates*. **21**. pp.1-23. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Thornber, P.J., Peter, G.F. and Nechushtai, R. (1987) Biochemical composition and structure of the photosynthetic pigment-proteins from higher plants. *Physiol. Plant.* **71**:236-240.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Trench, R.K. (1993) Microalgal-invertebrate symbioses: a review. *Endocytobiosis Cell Res.* **9**:135-175.

Trench, R.K. and Thinh, L-V. (1995) *Gymnodinium linucheae* sp. nov: the dinoflagellate symbiont of the jellyfish *Linuche unguilata*. **30**:149-154.

Trench, R.K. and Blank, R.J. (1987) *Symbiodinium microadriaticum* Freudenthal. *S. goreauii* sp. nov. *S. kawagutii* sp. nov. and *S. pilosum* sp. nov gymnodinioid dinoflagellate symbionts of marine invertebrates. *J. Phycol.* **23**:469-481.

Triplett, E. L., Jovine, R: V:M., Govind, N.S., Roman, S.J., Chang, S.S. and Prézelin, B.B. (1993) Characterization of two full-length cDNA sequences encoding for apoproteins of peridinin-chlorophyll *a*-protein (PCP) complexes. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **2**:246-254.

Vierling, E. and Alberte, R.S. (1983) P700 chlorophyll *a*-protein. Purification characterization and antibody preparation. *Plant Physiol.* **72**:625-633.

Walters, R.G. and Horton, P. (1991) Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluoresce quenching in barley leaves. *Photosynth. Res.* **27**:121-133.

Weis, E. and Bery, J.A. (1987) Quantum efficiency of photosystem II in relation to 'energy'-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta.* **894**:198-208.

Yang, D.H., Webster, J., Adam, Z., Lindahl, M., Andersson, B. (1998) Induction of Accimative Proteolysis of the Light-harvesting Chlorophyll *a/b* Proetin of Photosystem II. In Response to Elevated Light Intensities *Plant Physiol.* **118**:827-834.