



R. 4308

COMPOSICION, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS DEL COM  
PLEJO ENZIMATICO NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA DEL ALGA VERDE  
*Ankistrodesmus braunii*

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias  
Biológicas por el Licenciado MIGUEL ANGEL DE LA ROSA ACOSTA

Miguel de la Rosa

Sevilla, Enero de 1981

Director

José M. Vega

Dr. José M. Vega Piqueres  
Prof. Agregado de Bioquímica

Ponente

Manuel

Dr. Manuel Losada Villasante  
Catedrático de Bioquímica

T.D. 36

A mis padres

A Lola

A mi hijo .

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla que dirige el Profesor D. Manuel Losada Villasante, a quien agradezco el haberme acogido en su equipo de investigación, así como su orientación e interés en la realización de este trabajo.

Al Dr. José M. Vega agradezco su constante interés en mi formación científica y su inapreciable labor en la dirección de esta Tesis.

Al Dr. Jesús Diez Dapena agradezco su valiosa ayuda en los inicios de mi formación investigadora. Al Dr. Carlos Gómez-Moreno y a Antonia Herrero y Antonio Márquez agradezco su estrecha colaboración en la obtención de parte de los resultados aquí presentados.

Al Dr. Walter G. Zumft, de la Universidad de Erlangen-Nürnberg (R.F.A.), deseo expresar mi agradecimiento por los estudios al microscopio electrónico y los espectros de resonancia paramagnética del electrón que aquí se presentan. Al Dr. Julio López-Gorgé, de la Estación Experimental del Zaidín (Granada), agradezco la realización del análisis de aminoácidos de la nitrato reductasa.

A los demás miembros de este Departamento, especialmente a mi hermano Francisco Fernando, a la Dra. Norma Kerber y a Emilio Fernández agradezco profundamente su amistad, colaboración y apoyo.

Por último, quiero expresar la ayuda económica recibida de las siguientes instituciones: Universidad de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Comisaría de Energía del Ministerio de Industria y Energía, Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica, National Science Foundation (U.S.A.) y laboratorios Philips (Holanda).

INDICE

ABREVIATURAS .....	10
I. INTRODUCCION .....	12
II. MATERIALES Y METODOS .....	30
A. CULTIVO Y RECOGIDA DE CELULAS .....	31
1. <i>Material biológico</i> .....	31
2. <i>Condiciones de cultivo</i> .....	31
3. <i>Recogida de células</i> .....	33
B. ENZIMAS .....	35
1. <i>Preparación de extractos crudos</i> .....	35
2. <i>Determinación de actividades enzimáticas</i> .....	36
2.1. <u>NAD(P)H-nitrato reductasa</u> .....	36
2.2. <u>NAD(P)H-citocromo c reductasa</u> .....	37
2.3. <u>BVH-, MVH-, FMNH<sub>2</sub>- y FADH<sub>2</sub>-nitrato reductasa.</u> .....	37
2.4. <u>Alcohol deshidrogenasa</u> .....	38
2.5. <u>Catalasa</u> .....	38
C. DETERMINACIONES ANALITICAS .....	39
1. <i>Proteína</i> .....	39
2. <i>Nitrito</i> .....	39
3. <i>Piridín nucleótidos</i> .....	40
4. <i>Citocromo c</i> .....	40
5. <i>Análisis cuantitativo de los grupos prostéticos de la nitrato reductasa</i> .....	40
5.1. <u>Flavina</u> .....	40
5.2. <u>Hemo</u> .....	41
5.3. <u>Hierro</u> .....	42
5.4. <u>Molibdeno</u> .....	43
5.5. <u>Sulfuro lábil</u> .....	45
6. <i>Análisis de aminoácidos</i> .....	45
D. TECNICAS EXPERIMENTALES .....	46
1. <i>Centrifugaciones</i> .....	46
2. <i>Centrifugaciones en gradiente de densidad de sacarosa</i> .....	47
3. <i>Cromatografía de filtración en Bio-Gel</i> .....	48
4. <i>Electroforesis</i> .....	49
4.1. <u>Electroforesis analítica en geles de poli-acrilamida</u> .....	49

II. D. 4.2.	<u>Tinción de proteína en los geles de electroforesis</u> .....	51
4.3.	<u>Localización de la actividad nitrato reductasa en los geles</u> .....	51
4.4.	<u>Electroforesis en dodecil sulfato sódico (SDS)</u> .....	52
4.5.	<u>Electroforesis en gradiente de concentración de acrilamida</u> .....	54
5.	<i>Determinaciones espectrofotométricas</i>	55
5.1.	<u>Medidas de absorbancia</u> .....	55
5.2.	<u>Espectros de absorción</u> .....	55
5.3.	<u>Densitogramas</u> .....	56
5.4.	<u>Espectrofotometría de doble longitud de onda. Determinación del estado redox del citocromo <i>b</i><sub>557</sub> de la nitrato reductasa</u> .....	56
6.	<i>Determinaciones espectrofotofluorimétricas</i> ....	59
7.	<i>Titulaciones potenciométricas</i> .....	59
7.1.	<u>Determinación del potencial normal del citocromo <i>b</i><sub>557</sub> de la nitrato reductasa</u> .....	59
7.2.	<u>Determinación del potencial normal de los procesos de inactivación y reactivación de la nitrato reductasa</u> .....	62
8.	<i>Resonancia paramagnética del electrón (EPR)</i> ...	64
9.	<i>Microscopía electrónica</i> .....	64
10.	<i>Establecimiento de condiciones anaeróbicas y de la presión parcial de oxígeno</i> .....	65
11.	<i>Medidas del pH</i> .....	66
12.	<i>Eliminación de sales y moléculas pequeñas</i> ....	67
E.	REACTIVOS .....	67
III.	RESULTADOS .....	69
A.	PURIFICACION HASTA HOMOGENEIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA DE <i>Ankistrodesmus braunii</i> .....	70
1.	<i>Método de purificación</i> .....	70
1.1.	<u>Tratamiento con sulfato de estreptomycin</u> ...	71
1.2.	<u>Cromatografía de afinidad I</u> .....	71
1.3.	<u>Cromatografía de afinidad II</u> .....	73
2.	<i>Criterio de pureza. Electroforesis analítica en geles de poli(acrilamida)</i> .....	77

III. B. ESTUDIOS CATALITICOS Y CINETICOS DE LA NITRATO REDUCTASA DE <i>A. braunii</i> .....	79
1. <i>pH</i> óptimo .....	79
2. <i>Temperatura</i> óptima .....	79
3. <i>Valores de <math>K_m</math> para los diferentes sustratos del enzima</i> .....	82
4. <i>Inhibidores de las distintas actividades del enzima</i> .....	84
5. <i>Protección específica por NADH frente a la inhibición por PHMB</i> .....	86
6. <i>Mecanismo cinético en el estado estacionario (steady state) de la actividad NADH-nitrato reductasa</i> .....	86
6.1. <u>Determinación de las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de los sustratos</u> .....	88
6.2. <u>Inhibición por nitrito de la actividad catalítica. Determinación de la <math>K_i</math> frente al NADH</u> .....	95
C. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL COMPLEJO ENZIMATICO NITRATO REDUCTASA Y DE SU(S) SUBUNIDAD(ES) .....	97
1. <i>Determinación del peso molecular de la nitrato reductasa</i> .....	97
1.1. <u>Filtración en gel y centrifugación en gradiente de sacarosa</u> .....	97
1.2. <u>Electroforesis en geles de diferente concentración de acrilamida</u> .....	100
1.3. <u>Electroforesis en gradiente de concentración de acrilamida</u> .....	102
2. <i>Determinación del peso molecular de la(s) subunidad(es) de la nitrato reductasa. Electroforesis en SDS</i> .....	104
3. <i>Estimación del número de subunidades que componen el complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa</i> .....	107
D. ANALISIS DE LA COMPOSICION DE LA NITRATO REDUCTASA DE <i>A. braunii</i> .....	107
1. <i>Análisis de aminoácidos</i> .....	109
2. <i>Espectros de absorción del enzima oxidado y reducido</i> .....	109
3. <i>Espectros de absorción de la nitrato reductasa nativa y del deflavoenzima</i> .....	119

III. D.	4.	<i>Espectros de emisión de fluorescencia de la nitrato reductasa. Participación de la flavina en la actividad catalítica</i>	122
	5.	<i>Espectros de resonancia paramagnética del electrón (EPR) de la nitrato reductasa oxidada y reducida</i>	124
	6.	<i>Análisis cuantitativo de grupos prostéticos del enzima</i>	124
E.		DETERMINACION DE LA SECUENCIA DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESDE EL NAD(P)H HASTA EL NITRATO..	127
	1.	<i>Requerimiento de grupos sulfhidrilos libres para la reducción con NAD(P)H del hemo de la nitrato reductasa</i>	127
	2.	<i>Participación de la flavina en la reducción por NAD(P)H del citocromo de la nitrato reductasa</i>	129
	3.	<i>Determinación del potencial normal del citocromo b<sub>557</sub> de la nitrato reductasa</i>	129
F.		DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO ENZIMATICO NITRATO REDUCTASA DE <i>A. braunii</i>	132
	1.	<i>Micrografía electrónica de la nitrato reductasa teñida negativamente</i>	132
	2.	<i>Procesamiento rotacional de imágenes de la nitrato reductasa por superposición óptica</i>	134
	3.	<i>Micrografía electrónica de la nitrato reductasa según la técnica sandwich</i>	134
	4.	<i>Modelo tentativo de la estructura de la nitrato reductasa</i>	137
G.		INTERCONVERSION POR OXIDO-REDUCCION DE LA NITRATO REDUCTASA DE <i>A. braunii</i>	137
	1.	<i>Requerimiento de oxígeno para la inactivación de la nitrato reductasa por incubación con NADH</i>	137
	2.	<i>Efecto de la presión parcial de oxígeno en la inactivación de la nitrato reductasa con NADH</i>	140
	3.	<i>Requerimiento de la actividad diaforasa del complejo enzimático para su inactivación por NADH</i>	140
	4.	<i>Inactivación de la nitrato reductasa por NADH. Protección por ditionito o superóxido dismutasa y estimulación por FAD</i>	143

III. G. 5. Efecto del manitol y del etanol sobre la inactivación del enzima por NADH .....	145
6. Protección por nitrato y cianato frente a la inactivación por NADH de la nitrato reductasa .....	145
7. Reactivación por nitrato del enzima inactivado por incubación con NADH .....	145
8. Localización del centro de inactivación del complejo nitrato reductasa a lo largo de su cadena de transporte .....	148
9. Estudio potenciométrico del proceso de inactivación de la nitrato reductasa .....	151
10. Estudio potenciométrico del proceso de reactivación de la nitrato reductasa inactiva.	154
IV. DISCUSION .....	157
V. CONCLUSIONES .....	194
VI. BIBLIOGRAFIA .....	197

## ABREVIATURAS

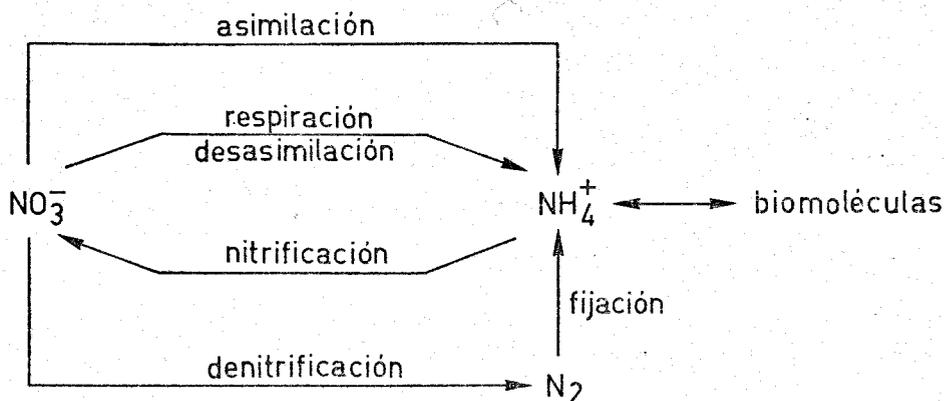
A	absorbancia
BV, BVH	bencil viológeno y su forma reducida
cit <i>c</i>	citocromo <i>c</i>
cit <i>c</i> Rasa	citocromo <i>c</i> reductasa
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
DTE	ditioeritritol
e	electrón
E°	potencial normal
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EPR	resonancia paramagnética del electrón
$\epsilon$	coeficiente de extinción
FAD, FADH <sub>2</sub>	flavin adenín dinucleótido y su forma reducida
FMN, FMNH <sub>2</sub>	flavín mononucleótido y su forma reducida
FN	FAD o FMN
<i>g</i>	aceleración de la gravedad
$\underline{g}$	constante característica de la molécula donde se encuentran los electrones desapareados
mA	miliamperio
MV, MVH	metil viológeno y su forma reducida
NADH	nicotinamín adenín dinucleótido reducido
NADPH	nicotinamín adenín dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H	NADH o NADPH
NO <sub>3</sub> Rasa	nitrato reductasa
<i>n</i>	número de electrones
<i>p</i> HMB	<i>p</i> hidroxi-mercuribenzoato
PM	peso molecular
rpm	revoluciones por minuto
<i>r</i> <sub>S</sub>	radio de Stokes
S	unidad Svedberg (10 <sup>-13</sup> s)
S <sub>20,w</sub>	coeficiente de sedimentación
SDS	dodecil sulfato sódico
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamina
Tris	Tri-(hidroxi)-metil aminometano

U	unidad de actividad enzimática
V	voltio
$v_o$	velocidad inicial
vol	volumen
$V_e$	volumen de elución
$V_o$	volumen vacío
$V_t$	volumen total
$V_{max}$	velocidad máxima de reacción a concentraciones 'infinitas' de ambos sustratos
$V_{max\ apar}$	velocidad máxima aparente a concentración 'infinita' de un sustrato y limitante del otro

## I. INTRODUCCION

El nitrógeno es uno de los elementos cualitativa y cuantitativamente más importantes de la materia viva. Puede existir en múltiples estados de oxidación que oscilan entre +5 en el nitrato (estado más oxidado) y -3 en el amoníaco y sus derivados (estado más reducido). El nitrógeno en su estado más reducido es encuentra como componente de las biomoléculas más importantes, como aminoácidos y proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos, coenzimas, etc. Una idea de la importancia cuantitativa de este elemento nos la da el hecho de que supone aproximadamente el 14% en peso de las proteínas.

Las distintas formas del nitrógeno pueden interconvertirse en la biosfera por procesos metabólicos que vistos en conjunto constituyen el ciclo del nitrógeno, el cual se sumariza en el siguiente esquema:



La vía de entrada del nitrógeno en los seres vivos es el reino vegetal (y ciertos microorganismos), a través del cual llega a los animales en el estado de máxima reducción correspondiente al nitrógeno orgánico. También las plantas necesi-

tan que el nitrógeno esté reducido al máximo, en forma de amonio, para poder combinarlo con compuestos carbonados y formar así las biomoléculas nitrogenadas. Sin embargo, a diferencia de los animales, los organismos vegetales tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno inorgánico existente en la Naturaleza y reducirlo hasta amonio, según las distintas vías anteriormente expuestas.

La reducción asimilatoria del nitrato hasta amonio es un proceso fundamental en Biología, que se presenta tanto en organismos fotosintéticos (plantas superiores, algas verdes y bacterias fotosintéticas) como no fotosintéticos (hongos, levaduras y bacterias). En general, se trata de un proceso no cíclico que requiere poder reductor, como se analizará más adelante, pero no ATP. Por otra parte, se puede distinguir un segundo tipo de reducción de nitrato en el que éste puede servir como aceptor terminal de electrones de la cadena respiratoria, sustituyendo de esta forma al oxígeno. Se trata, por tanto, de una reducción de nitrato a amonio de tipo respiratorio o disimilatorio, que está acoplada con fosforilación a nivel de sustrato (Zumft y Cárdenas, 1979).

Por otra parte, existe un pequeño grupo de bacterias cuya única fuente de energía es la oxidación de amonio o nitrito hasta nitrato, conocidas normalmente como bacterias quimio litotrofas nitrificantes. Por el contrario, las bacterias desnitrificantes mantienen una fosforilación acoplada al trans-

porte electrónico usando óxidos de nitrógeno como aceptores de electrones en ausencia de oxígeno, los cuales son reducidos hasta nitrógeno molecular (Zumft y Cárdenas, 1979).

Finalmente y completando el ciclo, se encuentra la fijación de nitrógeno molecular. Es un proceso asimilatorio que requiere poder reductor (seis electrones por molécula de nitrógeno fijada) y el concurso energético del ATP, y realizado por organismos fototróficos, heterotróficos, aeróbicos o aneróbicos, en simbiosis o libremente (Arnon *et al*, 1961; Fogg *et al*, 1973; Yates, 1976).

Alrededor de  $2 \cdot 10^2$  megatoneladas de nitrógeno se asimilan anualmente por fijación biológica de nitrógeno molecular (Burns y Hardy, 1975). Sin embargo, el reino vegetal incorpora una cantidad de nitrógeno que excede a la cifra anterior en casi dos órdenes de magnitud. Esto significa que la reducción asimilatoria de nitrato incorpora anualmente entre  $1 \cdot 10^4$  y  $2 \cdot 10^4$  megatoneladas de nitrógeno (Beevers y Hageman, 1969; Losada, 1972; Guerrero *et al*, 1981), lo que da idea de la importancia de este proceso. Por otra parte, el nitrógeno constituye el 2-10% del peso seco de las plantas frente al 40-50% de carbono (Bowen, 1966). La reducción del dióxido de carbono a carbohidratos requiere cuatro electrones, mientras que la reducción de nitrato a amonio y su posterior incorporación en aminoácidos implica diez electrones. Así pues, en algas y plantas superiores la cantidad de poder reductor generado fo-

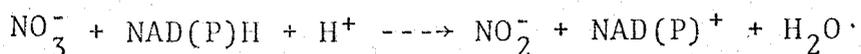
tosintéticamente requeridos para la reducción asimilatoria de nitrato es tan sólo cinco veces inferior a la que se necesita para la fijación del dióxido de carbono, indicando la importancia que tiene la reducción de nitrato dentro del proceso fotosintético.

La reducción asimilatoria de nitrato a amonio se ha estudiado exhaustivamente en diferentes laboratorios, habiéndose llegado a dilucidar en profundidad la naturaleza del proceso en bacterias, algas, hongos y plantas superiores. Gran número de revisiones relativas a diferentes aspectos del problema han aparecido recientemente: Hewitt, 1975; Syrett y Leftley, 1976; Kessler, 1976; Hewitt *et al*, 1976; Losada, 1976a; Garrett y Amy, 1978; Vennesland y Guerrero, 1979; Losada y Guerrero, 1979; Hewitt y Notton, 1980; Vega *et al*, 1980; Srivastava, 1980; Ullrich, 1980; Guerrero *et al*, 1981; Losada *et al*, 1981. El proceso transcurre en dos etapas enzimáticas independientes y sucesivas. La primera consiste en la reducción de nitrato a nitrito, con transferencia de dos electrones, catalizada por la molibdo proteína nitrato reductasa, y la segunda, la reducción de nitrito a amonio, que implica la transferencia de seis electrones y está catalizada por la ferroproteína nitrito reductasa.

Según el donador de electrones utilizado, la nitrato reductasa asimilatoria puede clasificarse en dos grupos: a) nitrato reductasa dependiente de piridín nucleótidos, la cual

se encuentra en organismos eucarióticos, tanto fotosintéticos como no fotosintéticos, y b) nitrato reductasa dependiente de ferredoxina, presente en cianobacterias (algas verdeazuladas) y también probablemente en bacterias fotosintéticas y quimio-ergónicas. La diferente especificidad por el donador de electrones conlleva unas diferencias bastante considerables en lo concerniente a grupos prostéticos y propiedades físico-químicas de estos dos tipos de enzimas.

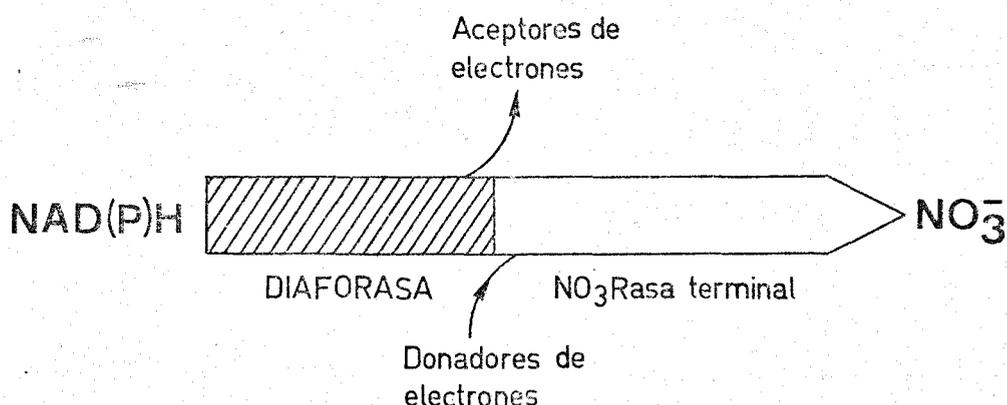
La nitrato reductasa de organismos eucarióticos (hongos, algas y plantas) cataliza la reducción de nitrato a nitrito con piridín nucleótidos reducidos de acuerdo con la siguiente ecuación:



$$\Delta G^\circ, \text{ pH } 7,0 = -34 \text{ Kcal.mol}^{-1}$$

Según la especificidad del enzima por el NADH o el NADPH, éste se denomina NADH-nitrato reductasa (EC 1.6.6.1.) en plantas superiores y algunas algas verdes, NAD(P)H-nitrato reductasa (EC 1.6.6.2.) en levaduras y otras algas verdes, y NADPH-nitrato reductasa (EC 1.6.6.3.) en mohos (Losada *et al*, 1981). Además de catalizar la reacción fisiológica, *i.e.* la reducción de nitrato con piridín nucleótidos, el enzima presenta otras dos actividades, que pueden ensayarse separadamente e implican sólo una parte de la cadena de transporte de electrones del complejo enzimático. La diaforasa {NAD(P)H-deshidrogenasa} constituye la primera mitad del complejo y cataliza la reducción con

NAD(P)H de una serie de aceptores de uno y dos electrones tales como ferricianuro, citocromo *c*, 2,6-diclorofenolindofenol, etc (Paneque y Losada, 1966; Paneque *et al*, 1968; Zumft *et al*, 1970). La llamada nitrato reductasa terminal o nitrato reductasa propiamente dicha constituye la segunda mitad del complejo y cataliza la reducción de nitrato a nitrito con flavín nucleótidos o viológenos reducidos (Losada *et al*, 1969).

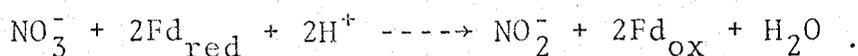


Estas dos actividades se afectan de forma específica por distintos inhibidores y tratamientos. En general, la mitad diaforasa es muy sensible al calentamiento a temperaturas suaves y al tratamiento con mercuriales del tipo del pHMB, que reacciona con los grupos sulfhidrilos de las proteínas. Ambos procesos pueden prevenirse de una forma específica por la presencia de NAD(P)H o, en algunas nitrato reductasas, de FAD en la mezcla de reacción (Relimpio *et al*, 1971; Vega *et al*, 1972; Losada, 1976a). Por otra parte, la nitrato reductasa terminal, que es notablemente resistente al tratamiento térmico y al mercurial, puede ser totalmente inhibida por compuestos quelantes

de metales, como la azida, cianuro, cianato o carbamil-fosfato (Vega *et al*, 1972; Lorimer *et al*, 1974; Losada, 1976a).

Los estudios físico-químicos realizados permiten asegurar que la NAD(P)H-nitrato reductasa contiene FAD, hemo del tipo  $b_{557}$  y molibdeno (Garrett y Amy, 1978; Hewitt y Notton, 1980; Losada *et al*, 1981). La participación del FAD en la mitad diaforasa del enzima y del molibdeno en la mitad terminal son hechos bien establecidos (Garrett y Nason, 1969; Zumft *et al*, 1970; Vega *et al*, 1971), mientras que la localización del grupo hemo permanece sin aclarar. Por otra parte, la nitrato reductasa de eucariotas es un enzima oligomérico cuyo peso molecular oscila entre 197.000 y 500.000, y compuesto por un número variable de subunidades (entre 2 y 8) aparentemente idénticas (Hewitt y Notton, 1980; Guerrero *et al*, 1981).

La ferredoxina-nitrato reductasa de organismos procariotas se encuentra, en general, unida a membranas fotosintéticas, a diferencia de lo que ocurre con la NAD(P)H-nitrato reductasa de eucariotas que es un enzima soluble (Vennesland y Guerrero, 1979). La nitrato reductasa de procariotas no parece tener una actividad diaforasa similar a la de los enzimas de eucariotas, por lo que no pueden aceptar electrones directamente de los piridín nucleótidos, y son, por tanto, dependientes de ferredoxina reducida como donador fisiológico de electrones (Hattori, 1970; Manzano *et al*, 1976; Ortega *et al*, 1976).



$$\Delta G^\circ, \text{ pH } 7,0 = -38,6 \text{ Kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$$

La nitrato reductasa de procariotas ha sido mucho menos estudiada que la de eucariotas. La ferredoxina-nitrato reductasa de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas capsulata* se ha purificado recientemente (Alef y Klemme, 1979), encontrándose que se trata de una proteína de peso molecular 185.000, con dos subunidades iguales de 85.000, y que no posee FAD pero sí molibdeno y hemo del tipo *c*. La ferredoxina-nitrato reductasa se ha purificado también en la cianobacteria *Anacystis nidulans*, determinándose que se trata de una molibdo proteína constituida por una sola cadena polipeptídica de peso molecular 75.000, y que no contiene FAD ni hierro hemínico (Candau, 1979). Respecto a los estudios de inhibición realizados en estas enzimas, el cianuro y el pHMB se comportan como poderosos inhibidores (Guerrero *et al*, 1973; Villalobo *et al*, 1977). La ferredoxina-nitrato reductasa de procariotas probablemente sea un precursor de la nitrato reductasa de eucariotas, la cual adquiriría posteriormente la capacidad para usar NAD(P)H al incorporar la mitad diaforasa inicial conteniendo FAD (Losada y Guerrero, 1979).

El segundo enzima de la ruta de asimilación de nitrato, la nitrito reductasa, se ha identificado como dependiente de ferredoxina en organismos fotosintéticos (Vega *et al*, 1980) y de piridín nucleótidos en organismos no fotosintéticos (Garrett y

Amy, 1978; Guerrero *et al*, 1981). Ambos enzimas catalizan la reducción de nitrito a amonio en una reacción que implica la transferencia de seis electrones. La ferredoxina-nitrito reductasa está constituida por una única cadena polipeptídica de peso molecular 60.000-70.000, y contiene un grupo hemo identificado como sirohemo (Vega *et al*, 1980), así como un centro hierro-azufre tetranuclear del tipo 4Fe-4S (Lancaster *et al*, 1979). La NAD(P)H-nitrito reductasa, de peso molecular y número de subunidades variable según el organismo, contiene FAD y sirohemo como grupos prostéticos (Vega *et al*, 1975a; Garrett y Amy, 1978). Agrupaciones sulfo-férricas semejantes a las de la nitrito reductasa fotosintética no se han publicado hasta la fecha en la NAD(P)H-nitrito reductasa, aunque Greenbraum *et al* (1978) han sugerido que el enzima de *Neurospora* contiene hierro no hemínico.

Muchos intentos se han hecho para purificar a homogeneidad la NAD(P)H-nitrato reductasa con resultados poco satisfactorios, ya que hasta 1975 sólo se habían conseguido preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas (Hewitt, 1975). El enzima del alga verde *Chlorella vulgaris* fue el primero purificado hasta homogeneidad electroforética utilizando técnicas convencionales (Solomonson *et al*, 1975). Se trata de un complejo enzimático de peso molecular 365.000, compuesto por tres subunidades iguales de 100.000, y que contiene dos moléculas de FAD y dos de hemo, así como dos átomos de molibdeno (Solomonson *et al*, 1975).

La cromatografía de afinidad como técnica para la purificación de proteínas y otras estructuras biológicas ha despertado gran interés en los últimos años (Wilcheck y Jacoby, 1974). Dicha técnica se basa en el alto grado de especificidad de las interacciones biológicas, como pueden ser las del tipo de enzima-sustrato, enzima-inhibidor competitivo, antígeno-anticuerpo, etc (Cuatrecasas *et al.*, 1968). Ya antes de 1975 el cromóforo azul dextrano, cuya conformación simula la orientación de los anillos aromáticos y grupos aniónicos de los nucleótidos (Thompson *et al.*, 1975), covalentemente unido a la Sefarosa 4B (Cuatrecasas, 1970), se había empleado para la purificación de enzimas como la fosfofructoquinasa (Kopperschlager *et al.*, 1971), piruvatoquinasa (Blume *et al.*, 1971; Staal *et al.*, 1971), lactato deshidrogenasa (Ryan y Vestling, 1974) y otras (Thompson *et al.*, 1975). Todas estas proteínas se caracterizan por tener un determinado tipo de estructura denominada 'pliegue dinucleotídico', conocida por ser el sitio de unión para los nucleótidos en diferentes enzimas (Thompson *et al.*, 1975). Basado en estos resultados, Solomonson (1975) aplicó por primera vez la cromatografía de afinidad en Sefarosa-azul dextrano a la purificación de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*, consiguiendo magníficos resultados en lo que se refiere a rapidez, simplicidad, eficiencia y economía. Posteriormente, este procedimiento se ha aplicado con éxito al enzima de otros organismos como *Rhodotorula glutinis* (Guerrero y Gutiérrez, 1977), *Aspergillus nidulans* (Downey y Steiner, 1978), soja (Campbell,

1976), arroz (Shen *et al*, 1976), espinaca (Notton *et al*, 1977), o cebada (Kuo *et al*; 1980).

Aunque la NAD(P)H-nitrato reductasa de *Ankistrodesmus braunii* se había purificado anteriormente por un método basado en técnicas convencionales (Ahmed y Spiller, 1976), la baja actividad específica conseguida (0,6 unidades/mg de proteína), con un factor de purificación de tan sólo 30 veces y una recuperación del 30% respecto al extracto crudo, indujo a intentar otros métodos más efectivos de purificación. Por otra parte, el éxito conseguido al aplicar la cromatografía de afinidad con azul dextrano a la purificación de la nitrato reductasa de otros orígenes, según se ha indicado anteriormente, incitó a usar esta misma técnica como etapa básica para la purificación del enzima de *A. braunii*. Las principales características del comportamiento del enzima durante el proceso cromatográfico, así como las condiciones óptimas para purificar por cromatografía de afinidad la nitrato reductasa de *A. braunii* se han determinado (De la Rosa, 1977; Diez, 1978; De la Rosa *et al*, 1980a), las cuales han supuesto la base de partida para purificar este enzima hasta homogeneidad electroforética con una actividad específica de 49 U/mg y una recuperación del 70% (De la Rosa *et al*, 1978, 1980b; Diez, 1978). En este trabajo se describe un nuevo método de purificación, empleando dos veces la cromatografía de afinidad en azul-Sefarosa, que permite obtener preparaciones enzimáticas con una actividad específica de hasta 80 U/mg, con un factor de purificación de 1.600 veces y una recuperación del 32%.

Se ha demostrado que la capacidad de asimilar nitrato por los organismos varía en respuesta a las condiciones ambientales como luz, temperatura, tensiones de oxígeno y anhídrido carbónico, fuente de nitrógeno y otros factores, cambios que generalmente también afectan a los niveles de actividad nitrato reductasa en las células (Beevers y Hageman, 1969; 1972; Morris, 1974; Hewitt, 1975; Losada *et al*, 1981). La mayor parte de los trabajos realizados sobre estos efectos no permiten sacar conclusiones claras acerca del mecanismo de control que actúa en cada caso, por lo que la idea actualmente aceptada es que la asimilación de nitrato es susceptible de control a varios niveles.

El efecto antagónico del amonio en la asimilación del nitrato es un hecho bien documentado, y se pueden distinguir efectos a corto, medio y largo plazo sobre la utilización del nitrato por las algas verdes. La presencia de amonio en el medio de cultivo provoca un bloqueo inmediato de la entrada de nitrato al interior de las células (Syrett y Leftley, 1976; Pistorius *et al*, 1978; Florencio *et al*, 1980). Por otra parte, el amonio afecta al nivel de la actividad nitrato reductasa, que disminuye, a largo plazo como consecuencia de la represión de la síntesis de los enzimas del sistema reductor de nitrato, y a medio plazo debido a la inactivación del complejo nitrato reductasa (Syrett y Morris, 1963; Losada *et al*, 1970; Herrera *et al*, 1972).

Un posible punto de control sería, por tanto, la actividad del enzima nitrato reductasa, capaz de existir en dos formas metabólicamente interconvertibles, una activa y otra inactiva. La proporción relativa de cada forma parece depender de las condiciones intracelulares, tales como los niveles de NAD(P)H y de nitrato, los cuales en esencia responden a las condiciones ambientales (Losada *et al*, 1981). Así, la presencia de amonio en el medio conduce a una completa conversión de todo el enzima a su forma inactiva en el plazo de 1-2 h, siendo reactivado *in vivo* por la adición de nitrato una vez consumido todo el amonio (Losada *et al*, 1970; Rigano, 1970; Pistorius *et al*, 1976). El enzima también puede ser inactivado *in vitro* por incubación con piridín nucleótidos reducidos (Moreno *et al*, 1972; Losada *et al*, 1973; Diez, 1977), siendo la inactivación potenciada por el ADP (Maldonado *et al*, 1973; Diez, 1978). El enzima inactivado *in vivo* por amonio o *in vitro* por NADH con o sin ADP puede ser reactivado *in vitro* por oxidación con ferricianuro (en segundos) o con nitrato, su sustrato fisiológico, (en horas) (Vega *et al*, 1972; Herrera *et al*, 1972).

La inactivación del complejo enzimático nitrato reductasa implica la pérdida de su actividad terminal, que no de la diaforasa, y parece deberse a la reducción de uno de sus grupos funcionales (Losada, 1974; 1976a), probablemente el molibdeno (Hewitt *et al*, 1979; Hewitt y Notton, 1980). Respecto al posible mecanismo fisiológico de este proceso en algas verdes, Losada y cols. han propuesto que el efecto del amonio se debe a su

acción como desacoplante de la fotofosforilación no cíclica, aumentando los niveles de piridín nucleótidos reducidos y de los nucleótidos descargados de adenina (Chaparro *et al*, 1976; Losada, 1976a; 1976b). La forma activa correspondería al estado oxidado del enzima y la reducida, a la inactiva. Por el contrario, el grupo de Vennesland en Berlín propone que la forma inactiva de la nitrato reductasa representa un complejo del cianuro con el enzima reducido (Gewitz *et al*, 1974; Solomonson y Spehar, 1979). No obstante, la formación del cianuro no se ha relacionado de una forma concluyente con la presencia de amonio en el medio, aunque la histidina (Gewitz *et al*, 1976; 1980) y la oxima del ácido glioxílico (Solomonson y Spehar, 1977) se han postulado como posibles precursores del cianuro.

En base a estas hipótesis discrepantes nos hemos planteado un estudio a fondo del mecanismo de interconversión *in vitro* de la actividad enzimática del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa de *A. braunii*.

Los resultados que se presentan en este trabajo suponen una importante contribución al conocimiento de las propiedades físico-químicas y cinéticas, composición y estructura del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa de *A. braunii*, así como su mecanismo de acción e interconversión *in vitro*. Los principales logros pueden resumirse en los siguientes puntos:

- Puesta a punto de un método de purificación que permite obtener con rapidez y economía suficiente cantidad de enzima puro para posteriores estudios.
- Caracterización de las propiedades catalíticas del enzima, y mecanismo de la reacción enzimática que cataliza.
- Estudio físico-químico de la proteína, como determinación del peso molecular, composición de subunidades, análisis de aminoácidos y determinación cualitativa y cuantitativa de sus grupos prostéticos.
- Demostración de la funcionalidad de los grupos prostéticos en el ciclo catalítico del enzima, y establecimiento de la cadena transportadora de electrones en la molécula de proteína.
- Determinación de la estructura de la molécula de enzima por microscopía electrónica, indicando el ensamblaje tridimensional de las subunidades componentes de la proteína.
- Estudio potenciométrico de la interconversión redox de la actividad nitrato reductasa, utilizando preparaciones homogéneas de enzima.

Parte de los resultados presentados en este trabajo se han publicado en forma de:

A) Artículos en revistas:

1. PURIFICATION AND PROPERTIES OF ASSIMILATORY NITRATE REDUCTASE {NAD(P)H} FROM *Ankistrodesmus braunii*  
De la Rosa, M.A., Diez, J., Vega, J.M. y Losada, M.  
*European Journal of Biochemistry* 106, 249-256, 1980

2. CATALYTIC PROPERTIES OF *Ankistrodesmus braunii* NITRATE REDUCTASE

Herrero, A., De la Rosa, M.A., Diez, J. y Vega, J.M.  
*Plant Science Letters* 17, 409-415, 1980

3. STUDIES ON THE PHOTOSYNTHETIC ASSIMILATION OF NITRATE IN GREEN ALGAE

Vega, J.M., Florencio, F.J. y De la Rosa, M.A.  
*Proceedings of the 5th International Congress on Photosynthesis*, en prensa, 1981

B) Resúmenes presentados a Congresos:

1. NITRATO REDUCTASA DE *Ankistrodesmus braunii*. II: GRUPOS PROSTETICOS E INTERCONVERSION

Diez, J., De la Rosa, M.A. y Vega, J.M.

III Reunión de la Sociedad Española de Fisiología Vegetal, Resúmenes 48, Granada, 1978

2. ESTUDIOS CINETICOS DE LA NITRATO REDUCTASA DEL ALGA VERDE *Ankistrodesmus braunii*

Herrero, A., De la Rosa, M.A., Diez, J. y Vega, J.M.

XVI Reunión de la Sociedad Española de Bioquímica, Resúmenes 62, Madrid, 1978

3. NITRATO REDUCTASA DE *Ankistrodesmus braunii*. PROPIEDADES MOLECULARES E INTERCONVERSION POR OXIDO-REDUCCION

De la Rosa, M.A., Diez, J. y Vega, J.M.

VIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica, Resúmenes 91, Murcia, 1979

4. STUDIES ON THE PHOTOSYNTHETIC ASSIMILATION OF NITRATE IN GREEN ALGAE

- Vega, J.M.: Florencio, F.J. y De la Rosa, M.A.  
V International Congress on Photosynthesis, Resúmenes  
599, Halkidiki (Grecia), 1980
5. METALOENZIMAS DEL SISTEMA REDUCTOR DE NITRATO EN ORGANISMOS FOTOSINTETICOS  
Vega, J.M., De la Rosa, M.A. y Gómez-Moreno, C.  
I Congreso Hispano-Portugués de Bioquímica, Resúmenes  
S23, Coimbra (Portugal), 1980
6. REGULACION DE LA ASIMILACION FOTOSINTETICA DE NITRATO EN ALGAS VERDES  
Vega, J.M., Florencio, F.J. y De la Rosa, M.A.  
I Congreso Hispano-Portugués de Bioquímica, Resúmenes  
S45, Coimbra (Portugal), 1980
7. ESTUDIO FISICO-QUIMICO DEL COMPLEJO ENZIMATICO NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA DEL ALGA VERDE *Ankistrodesmus braunii*  
De la Rosa, M.A., Gómez-Moreno, C. y Vega, J.M.  
I Congreso Hispano-Portugués de Bioquímica, Resúmenes  
P93, Coimbra (Portugal), 1980
8. COMPOSITION AND STRUCTURE OF *Ankistrodesmus braunii* NITRATE REDUCTASE  
De la Rosa, M.A., Vega, J.M. y Zumft, W.G.  
XIV Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Meeting, Edimburgo (Escocia), 1981

## II. MATERIALES Y METODOS

## II.A. CULTIVO Y RECOGIDA DE CELULAS

### II.A.1. *Material biológico*

El microorganismo utilizado en el presente trabajo ha sido *Ankistrodesmus braunii*, estirpe 202-7c procedente de la colección de cultivos de la Universidad de Göttingen (R.F.A.). Se trata de un alga verde unicelular, no flagelada (Fig. 1), que pertenece al orden Chlorococcales.

### II.A.2. *Condiciones de cultivo*

Las células se cultivaron autotróficamente, usando un medio sintético esencialmente igual al descrito por Kessler *et al* (1963). El medio de cultivo contenía:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 14,5 mM;  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 2,5 mM;  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM;  $\text{FeSO}_4$ , 36  $\mu\text{M}$ ;  $\text{KNO}_3$ , 10 mM;  $\text{ZnSO}_4$ , 0,7  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MnCl}_2$ , 2,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 10  $\mu\text{M}$ ;  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 mM;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 8  $\mu\text{M}$ ;  $\text{NaCl}$ , 8 mM; y EDTA (sal disódica), 21,5  $\mu\text{M}$ . A continuación, unas gotas de silicona se añadían como agente antiespumante.

Las células se crecieron a 25°C a la luz en tubos o botellas de un volumen adecuado a las necesidades, haciéndose pasar una corriente de aire enriquecida en  $\text{CO}_2$  al 5% (v/v). La iluminación se realizó con tubos fluorescentes de luz blanca que proporcionaban 15-20  $\text{W/m}^2$  en la superficie de los recipientes de cultivo.

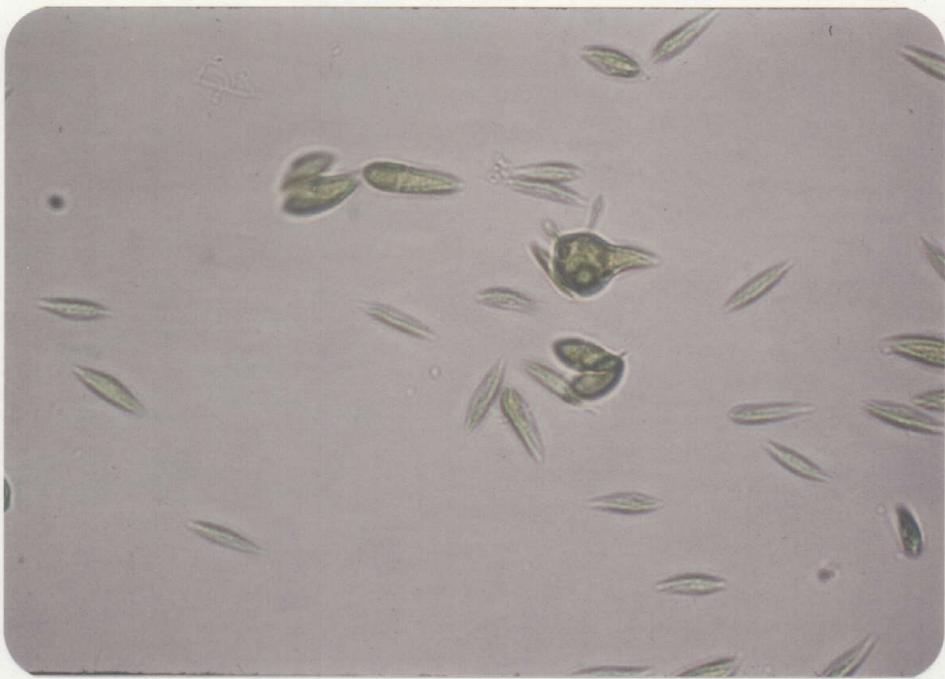


Figura 1. *Fotografía al microscopio óptico del alga verde unicelular Ankistrodesmus braunii.*

Para la preparación del inóculo inicial se partió de células cultivadas en medio sólido, de igual composición que el medio líquido pero suplementado con agar al 1,5% (p/v). Estas células se cultivaban en frascos de fermentación de 200 ml de capacidad, en las condiciones descritas anteriormente. En estos casos se mantenían condiciones asépticas que se conseguían calentando el medio de cultivo en un autoclave SELECTA (España) modelo P, durante 20 min a la presión de 1 atm (121°C). A partir de los inóculos se hacían trasvases sucesivos a recipientes de 1, 5, 20 y 40 l de capacidad (Fig. 2), para el cultivo de grandes masas de células. En estos casos el medio de cultivo se usó sin esterilizar, ya que dada la ausencia de compuestos orgánicos no se presentaban problemas de contaminación durante el período de crecimiento (3-4 días), como podía comprobarse por examen microscópico de los cultivos.

### III.A.3. *Recogida de células*

Las células se recogieron en su fase exponencial de crecimiento ( $A_{660} = 1,5-2$ ) por centrifugación en el sistema de flujo continuo de Szent-Gyorgyi & Blum, adaptado a una centrífuga SORVALL (U.S.A.) modelo RC2-B y operado a 23.000 x g con un caudal de 1 l/min. En otras ocasiones se usó una centrífuga SHARPLES (Francia) de flujo continuo a 30.000 x g y 1,5 l/min.

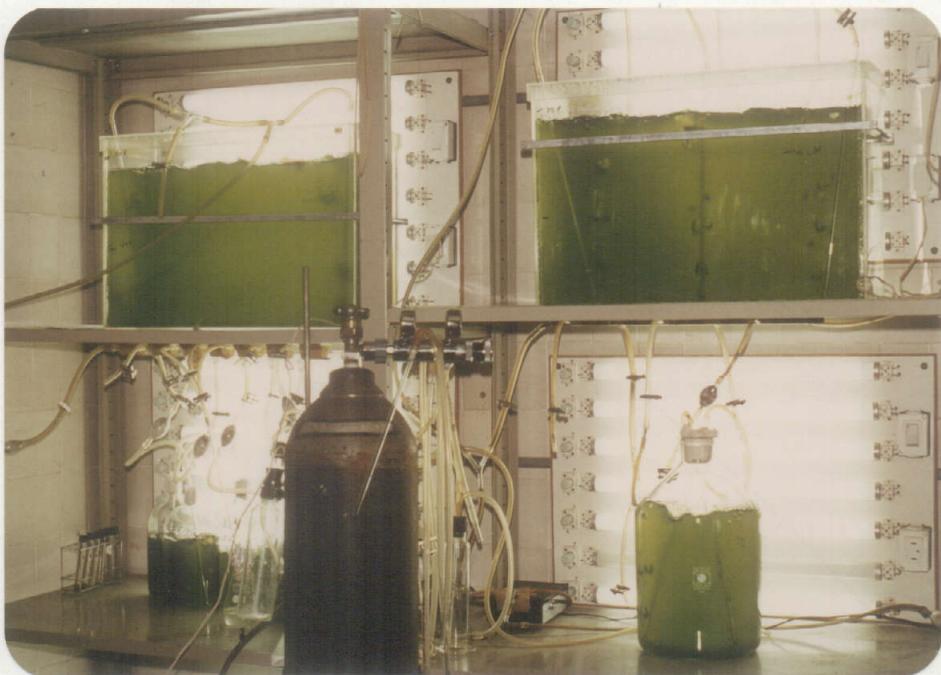


Figura 2. Instalaciones utilizadas para el cultivo de células. La cámara de cultivo, climatizada, se encontraba siempre a 23-25°C. Los cultivos se iluminaban también frontalmente con pantallas portátiles de tubos fluorescentes.

En las condiciones descritas el rendimiento obtenido era de 1-2 g (peso fresco) de células por litro de cultivo. Las células se almacenaban a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, generalmente antes de dos meses, sin pérdida significativa de actividad nitrato reductasa.

## II.B. ENZIMAS

### II.B.1. *Preparación de extractos crudos*

Aproximadamente 100 g (peso fresco) de células, después de descongeladas, se mezclaron con 500 ml de perlas de vidrio de 0,25-0,30 mm de diámetro y con 20 ml de tampón fosfato potásico 10 mM (pH 7,0) conteniendo DTE 0,15 mM; EDTA 0,10 mM y FAD 20  $\mu\text{M}$  (tampón estándar). La mezcla se agitó suavemente con una varilla de vidrio hasta conseguir una pasta homogénea que se sometió a vibración en un homogeneizador BUHLER (R.F.A.) modelo Vi2 durante 5 min a  $0^{\circ}\text{C}$ , con períodos alternativos de alta y baja velocidad de 30 s cada uno. El material roto se extrajo con el tampón anteriormente indicado (7 ml de tampón por g de células), y se filtró a través de cuatro capas de gasa para retener las perlas de vidrio. El homogenado resultante se centrifugó a  $17.000 \times g$  durante 30 min, y se recogió el sobrenadante como extracto crudo libre de células a partir del cual se purificó la nitrato reductasa.

## II.B.2. *Determinación de actividades enzimáticas*

### II.B.2.1. NAD(P)H-nitrato reductasa

La actividad NAD(P)H-nitrato reductasa se determinó por dos procedimientos. El primero consistió en medir espectrofotométricamente a 340 nm la oxidación del NAD(P)H que acompaña estequiométricamente a la reducción del nitrato (Hageman y Hucklesby, 1971). En cubetas de espectrofotómetro se prepararon las mezclas de ensayo que contenían, en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu\text{mol}$  de tampón Tris-HCl (pH 7,5), 10  $\mu\text{mol}$  de nitrato potásico y 0,15  $\mu\text{mol}$  de NAD(P)H, así como una adecuada cantidad de enzima. Se siguió primero la desaparición de NAD(P)H en ausencia de nitrato con el fin de detectar la presencia de alguna actividad oxidasa inespecífica; hecho esto se añadió el nitrato para iniciar la reacción, la cual se siguió a temperatura ambiente.

El segundo procedimiento consistió en medir colorimétricamente el nitrito aparecido como consecuencia de la reducción del nitrato (Paneque y Losada, 1966). La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu\text{mol}$  de Tris-HCl (pH 7,5), 10  $\mu\text{mol}$  de nitrato potásico y 0,30  $\mu\text{mol}$  de NAD(P)H, así como una adecuada cantidad de enzima. A los 5-10 min de incubación a 30°C se detuvo la reacción por acidificación de la mezcla y se determinó el nitrito formado (ver apdo. II.C.2.).

### II.B.2.2. NAD(P)H-citocromo *c* reductasa

Se determinó espectrofotométricamente siguiendo el incremento de absorbancia a 550 nm que acompaña a la reducción del citocromo *c* (Aparicio *et al*, 1969). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu\text{mol}$  de Tris-HCl (pH 7,5), 0,06  $\mu\text{mol}$  de citocromo *c* oxidado y 0,15  $\mu\text{mol}$  de NAD(P)H, además de una adecuada cantidad de enzima. La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz a temperatura ambiente.

### II.B.2.3. BVH-, MVH-, FMNH<sub>2</sub>- y FADH<sub>2</sub>-nitrato reductasa

La segunda actividad parcial de complejo enzimático reductor de nitrato se determinó midiendo colorimétricamente el nitrito aparecido como consecuencia de la reducción del nitrato, usando flavinas (FMN o FAD) o viológenos (BV o MV) químicamente reducidos con ditionito como donadores de electrones (Paneque *et al*, 1965). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu\text{mol}$  de Tris-HCl (pH 7,5), 10  $\mu\text{mol}$  de nitrato potásico, 4,6  $\mu\text{mol}$  de ditionito sódico y, según los casos, 2  $\mu\text{mol}$  de flavina o 1,5  $\mu\text{mol}$  de viológeno. Tras la adición de una adecuada cantidad de enzima, la solución se incubó a 30°C durante 5-10 min, al cabo de lo cual se detuvo la reacción por agitación vigorosa hasta que todo el ditionito quedó oxidado. El nitrito formado se determinó según se describe en el apdo. II.C.2.

#### II.B.2.4. Alcohol deshidrogenasa

La actividad alcohol deshidrogenasa se ensayó midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm, debido al NADH formado por oxidación del etanol (Bergmeyer *et al* , 1974). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 126  $\mu\text{mol}$  de  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , 126  $\mu\text{mol}$  de hidrocloreuro de semicarbazida, 37,5  $\mu\text{mol}$  de tampón glicina-NaOH (pH 8,8), 0,9 mmol de etanol y 1,5  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NAD}^+$ , además de una adecuada cantidad de enzima. La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz a temperatura ambiente.

#### II.B.2.5. Catalasa

La actividad catalasa se determinó midiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm, resultante de la descomposición del agua oxigenada (Lück, 1965). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 18  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y 45  $\mu\text{mol}$  de tampón fosfato potásico (pH 7,5), además de una adecuada cantidad de enzima. La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro de cuarzo y 1 cm de paso de luz, a temperatura ambiente.

Una unidad, U, de actividad enzimática representa la cantidad de enzima que en las condiciones de ensayo cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de producto, o la desaparición de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato, por min.

## II.C. DETERMINACIONES ANALITICAS

### II.C.1. *Proteína*

La proteína se determinó por el método de Lowry *et al* (1951), de acuerdo con las modificaciones realizadas por Bailey (1967), y usando seroalbúmina como proteína patrón. El coeficiente de extinción reportado por Rideal y Roberts (1951),  $\epsilon_{279} = 0,067 \text{ g}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ , se utilizó para determinar la concentración de seroalbúmina en los estándares.

### II.C.2. *Nitrito*

El nitrito se determinó por la reacción de diazotación de Griess-Illosway, según el método de Snell y Snell (1949). A la alícuota de 1 ml en que se desea determinar la cantidad de nitrito se le añade 1 ml de sulfanilamida al 1% (p/v) disuelta en HCl 2,5 M y 1 ml de N(-naftil)etilendiamina al 0,02% (p/v). Se deja desarrollar el color a temperatura ambiente durante 10 min y se lee la absorbancia a 550 nm. La concentración de nitrito se determinó en cada caso por com-

paración con una recta de calibrado hecha con cantidades conocidas de nitrito en semejantes condiciones.

### II.C.3. *Piridín nucleótidos*

Los piridín nucleótidos reducidos, NADH o NADPH, se determinaron espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 340 nm, usando el siguiente coeficiente de extinción:  $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### II.C.4. *Citocromo c*

La concentración del citocromo *c* reducido se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 550 nm, utilizando el coeficiente de extinción del citocromo *c* reducido menos oxidado a 550 nm igual a  $19,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (Yonetani, 1965).

### II.C.5. *Análisis cuantitativo de los grupos prostéticos de la nitrato reductasa*

#### II.C.5.1. Flavina

El contenido en flavina de la nitrato reductasa se determinó fluorimétricamente, según el método descrito por Koziol (1971). Debido a la rápida disociación de la flavina unida a la proteína en la nitrato reductasa de *A. brau-*

*ni*, la solución de enzima se dializó exhaustivamente frente a tampón fosfato potásico 10 mM (pH 7,0) conteniendo FAD 10  $\mu$ M. A continuación, la solución enzimática se filtró a través de una columna (1 x 13 cm) de Sephadex G-25 previamente equilibrada con el mismo tampón sin FAD, con el objeto de retirar la flavina libre, pero no la flavina asociada a la proteína. La ausencia de fluorescencia inmediatamente después de la filtración en Sephadex G-25 indicó la remoción de toda la flavina libre (ver apdo. III.D.3.). La preparación enzimática así obtenida, conteniendo aproximadamente 1 nmol de flavina, se trató con ácido tricloroacético al 10% durante 15 min a 0°C en una habitación con luz roja. Una alícuota del extracto se neutralizó inmediatamente con 0,25 volde  $K_2HPO_4$  4 M, mientras que una segunda alícuota se neutralizó de la misma forma después de 48 h de incubación en la oscuridad a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió a 530 nm usando un filtro de 435 nm para la excitación. Como estándar se usó una solución de riboflavina, cuya concentración se determinó exactamente midiendo las absorbancias a 268, 374 y 448 nm (Koziol, 1971).

#### II.C.5.2. Hemo

El contenido hemínico de la nitrato reductasa se determinó según el método de Paul *et al* (1953) con las modificaciones de Appleby y Morton (1959). A una alícuota de

0,5 ml conteniendo la nitrato reductasa se añadieron 0,2 ml de piridina y 0,3 ml de KOH 0,2 N. Después de la adición de unos cristallitos de ditionito sódico, se registró el espectro de absorción a 25°C frente a un blanco sin enzima tratado en idénticas condiciones. Como referencia se usó una solución de cloruro de hemina (ferroprotoporfirina IX) de concentración exactamente conocida.

#### II.C.5.3. Hierro

El contenido total en hierro de la nitrato reductasa se determinó en muestras conteniendo 5-10 nmol de hierro, según el método de Van de Bogart y Beinert (1967). Como estándar se usó una solución obtenida por disolución de 56 mg de hierro analítico (99,5% puro, Merck, R.F.A.) en 2 ml de HCl y 2 ml de HNO<sub>3</sub> comerciales, y posteriormente completada con agua destilada hasta 100 ml. Las preparaciones enzimáticas (≈2 ml) de nitrato reductasa se dializaron durante dos períodos de 24 h cada uno frente a 5 l de tampón Tris-acético 50 mM (pH 7,5) con EDTA 0,10 mM. Como blanco se usó el tampón utilizado en la segunda diálisis.

A muestras de 1 ml conteniendo los blancos, estándares o nitrato reductasa se añadieron 0,1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0,1 ml de HNO<sub>3</sub> comerciales. Después de agitar suavemente, se calentaron directamente sobre la llama del mechero hasta calcinación total de las muestras, con precaución para evitar pér-

didadas debido a las proyecciones. Posteriormente se añadió a cada muestra 0,05 ml de  $\text{HClO}_4$  comercial, y se volvieron a calentar sobre el mechero hasta su clarificación. Una vez enfriadas, se les añadió sucesivamente 0,5 ml de agua, 0,25 ml de ácido mercaptoacético (=tioglicólico) al 1% (p/v), 1,5 ml de una solución saturada de acetato sódico y 1 ml de una solución de 4,7-difenil-1,10-fenantrolina preparada por disolución de 136,3 mg en 250 ml de alcohol isoamílico. Después de agitar en un vibrador de alta velocidad durante 2 min, se centrifugaron a  $5.000 \times g$  durante 5 min en una centrífuga SELECTA (España) para separar las capas acuosa e isoamílica. Se extrajeron 0,5 ml de la fase orgánica y se leyó la absorbancia a 535 nm frente a alcohol isoamílico como blanco. El coeficiente de extinción a 535 nm calculado para el complejo hierro-fenantrolina fue  $\epsilon_{535} = 9.048 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

#### II.C.5.4. Molibdeno

El molibdeno se analizó por el procedimiento de Clark y Axley (1955), según las modificaciones introducidas por Solomonson *et al* (1975), utilizando muestras con 2-5 nmol de molibdeno. Los estándares se prepararon con  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  de grado analítico (99,5% puro, Merck, R.F.A.). Las preparaciones con la nitrato reductasa ( $\approx 2$  ml) se dializaron durante dos períodos de 24 h cada uno frente a 5 l de tampón Tris-Acético 50 mM (pH 7,5) con EDTA 0,10 mM. Como blanco se usó

el tampón utilizado en la segunda diálisis. El reactivo de ditiol al 0,02% (p/v) se preparó según el método de Cárdenas y Mortenson (1974): 1,0 g de tolueno-3,4-ditiol se disolvieron en 500 ml de NaOH al 1% (p/v) y se añadió ácido mercaptoacético gota a gota ( $\approx 8$  ml) hasta que apareció una turbidez opaca permanente.

A muestras de 1 ml conteniendo los blancos, estándares o la nitrato reductasa se añadieron 0,2 ml de  $H_2SO_4$  comercial, y se calentaron directamente sobre la llama del mechero hasta la calcinación total de las muestras. Una vez enfriadas, se les añadió gota a gota agua oxigenada al 30% (p/v) hasta su clarificación, y se vuelven a calentar sobre el mechero hasta que dejan de salir humos blancos. Después de enfriadas nuevamente, se les añadieron 3 ml de agua destilada, 1,5 ml de HCl comercial, 0,2 ml de KI al 50% (p/v) preparado recientemente, 0,01 ml de  $Na_2S_2O_3$  al 10% (p/v), 0,2 ml de ácido tartárico al 50% (p/v) y 2 ml del reactivo de ditiol. Después de 10 min, se añadió 1 ml de acetato de isoamilo a cada tubo y se agitaron vigorosamente en un vibrador de alta velocidad, dejándose a continuación otros 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a  $5.000 \times g$  durante 5 min, se sacó de cada tubo una alícuota de 0,5 ml aproximadamente de la fase orgánica, y se leyó la absorbancia a 680 nm frente a acetato de isoamilo. El coeficiente de extinción calculado para el complejo molibdeno-ditiol fue  $\epsilon_{680} = 20.160 M^{-1} \cdot cm^{-1}$

#### II.C.5.5. Sulfuro lábil

El método de King y Morris (1967) con las modificaciones introducidas por Siegel *et al* (1973) se empleó para las determinaciones analíticas de sulfuro lábil. Las soluciones estándares se prepararon con  $\text{Na}_2\text{S}$  de Merck (R.F.A.) (King y Morris, 1967). La preparación de nitrato reductasa (0,9 mg en 0,8 ml) se dializó durante 24 h frente a 5 l de tampón Tris-Acético 50 mM (pH 7,5) con EDTA 0,10 mM. Como blanco se utilizó el tampón de diálisis.

A muestras de 0,7 ml conteniendo los blancos, estándares o la nitrato reductasa se les añadieron 0,5 ml del reactivo de zinc alcalino preparado antes de usar {5 vol de acetato de zinc al 2,6% (p/v) con 1 vol de NaOH al 6% (p/v)}. Los tubos se taparon, agitaron y dejaron durante 2 h con agitación continua a temperatura ambiente. Se añadieron 0,1 ml de sulfato de N,N'-dimetil- $\rho$ -fenilendiamina 0,02 M preparado en HCl 7,2 N, seguido por 0,1 ml de  $\text{FeCl}_3$  0,03 M preparado en HCl 1,2 N. Después de 20 min, se leyó la absorbancia a 670 nm frente al blanco.

#### II.C.6. *Análisis de aminoácidos*

La composición de aminoácidos de la nitrato reductasa se determinó según el método de Spackman *et al* (1958), con un analizador de aminoácidos JEOL (Japón) modelo JLC-6AH.

Las muestras conteniendo 0,4 o 0,8 mg de nitrato reductasa homogénea se hidrolizaron con HCl 6 N bajo vacío durante 24 o 72 h a 110°C. La cisteína y la cistina se determinaron como ácido cistéico después de la oxidación con ácido perfórmico (Moore, 1963). El triptofano se determinó con tioglicerato según el método de Matsubara y Sasaki (1969).

## II.D. TECNICAS EXPERIMENTALES

### II.D.1. *Centrifugaciones*

Para la recogida de células, preparación de extractos celulares y en los distintos pasos de la purificación se emplearon centrífugas refrigeradas SORVALL (U.S.A.) modelo RC2-B, con rotores SS34 y GSA.

Las centrifugaciones a baja velocidad, menos de 5.000 x g, se realizaron a temperatura ambiente en pequeñas centrífugas SELECTA (España) de receptáculos basculantes.

Para centrifugación con flujo continuo se empleó el sistema Szent-Gyorgyi & Blum adaptado a una centrífuga SORVALL. También se empleó en ocasiones una centrífuga SHARPLES (Francia).

Para las centrifugaciones en gradiente de sacarosa se usó una ultracentrífuga BECKMAN SPINCO (U.S.A.) modelo L2-65B equipada con un rotor SW-65K de receptáculos basculantes.

## II.D.2. Centrifugaciones en gradiente de densidad de sacarosa

El coeficiente de sedimentación de la nitrato reductasa se determinó por centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa, de acuerdo con el procedimiento descrito por Martin y Ames (1961). Cada tubo de centrífuga contenía 4,6 ml de un gradiente lineal de sacarosa desde el 5% (p/v) en la parte superior del tubo hasta el 20% en el fondo, preparado en tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7,0) con DTE 0,15 mM, EDTA 0,10 mM y FAD 20  $\mu$ M. Para la formación del gradiente se empleó un aparato mezclador BUCHLER (U.S.A.) de dos compartimentos.

Se aplicaron muestras de 0,15 ml conteniendo la nitrato reductasa y/o las proteínas marcadoras en la parte superior de cada tubo, encima del gradiente. La centrifugación se llevó a cabo a 40.000 rpm durante 15 h en una ultracentrífuga refrigerada a 4°C con un rotor SW-65K.

Después de la centrifugación, los gradientes se eluyeron a un flujo de 9 ml/h empezando por el fondo del tubo, mediante un aparato *Densi-Flow* de BUCHLER (U.S.A.) acoplado a una bomba peristáltica LKB (Suecia). Se recogieron 23-24 fracciones de 4 gotas cada una.

Las proteínas marcadoras utilizadas fueron: seroalbúmina (100  $\mu\text{g}$  por gradiente), alcohol deshidrogenasa (10  $\mu\text{g}$ ) y catalasa (5  $\mu\text{g}$ ). La seroalbúmina se detectó por su absorbancia a 230 nm, y la alcohol deshidrogenasa y la catalasa, por sus actividades catalíticas

### II.D.3. *Cromatografía de filtración en Bio-Gel*

El radio de Stokes de la nitrato reductasa se estimó por filtración en gel, siguiendo el método descrito por Siegel y Monty (1966). Se utilizó una columna (2,5 x 50 cm) de Bio-Gel A 1,5 m (100-200 mesh) equilibrada con tampón fosfato sódico 50 mM (pH 7,5) suplementado con DTE 0,15 mM, EDTA 0,10 mM, FAD 20  $\mu\text{M}$  y NaCl 0,1 M.

Las soluciones con la nitrato reductasa y/o las proteínas marcadoras se prepararon en el tampón antes citado, y se suplementaron con sacarosa al 5% (p/v). Se tomaron muestras de 0,5 ml, se aplicaron con una jeringa en la parte superior del gel, y se realizó la elución con un flujo de 25 ml/h. De esta forma se determinó el volumen de elución,  $V_e$ , de cada proteína. El volumen vacío,  $V_o$ , de la columna se determinó a partir del volumen de elución de una muestra conteniendo azul dextrano al 0,3% (p/v). El volumen total,  $V_t$ , se estimó mediante calibrado de la columna vacía con agua.

Las proteínas marcadoras fueron: ovalbúmina (1 mg por muestra), seroalbúmina (1 mg), alcohol deshidrogenasa (22 U), catalasa (10 U), ferritina (2 mg) y fibrinógeno (3 mg). La alcohol deshidrogenasa y la catalasa se detectaron por su actividad, mientras que las demás se localizaban por su absorbancia a 230 nm.

Los resultados se trataron según Laurent y Killander (1964), representado  $(-\log K_{av})^{1/2}$ , donde  $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$ , en función del radio de Stokes.

#### II.D.4. *Electroforesis*

##### II.D.4.1. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida

Las separaciones electroforéticas analíticas se realizaron en geles de poliacrilamida al 5% (p/v) de acrilamida, usando el sistema discontinuo de gel de Jovin *et al* (1964).

El tampón electrolito (pH 8,3) estaba formado por Tris (3,6 g/l) y glicina (15,28 g/l), mientras que el tampón de los geles era Tris-HCl 3 M (pH 8,82) conteniendo N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) al 0,46% (v/v). Para la preparación de los geles al 5% de acrilamida se mez

claron 2 vol de una solución que contiene acrilamida al 20% (p/v) y bis-acrilamida al 0,8% (v/v), 1 vol de tampón de gel, 1 vol de agua destilada y 4 vol de una solución de persulfato amónico 6,1 mM preparada inmediatamente antes de usar. Para la preparación de geles a otras concentraciones de acrilamida se variaba el volumen de la solución de acrilamida, a la vez que se corregía el volumen final con agua destilada. Después de eliminar los gases disueltos mediante succión con una trompa de agua, se dejaron polimerizar los geles a temperatura ambiente en tubos de vidrio de 5 mm de diámetro interno y 10 cm de longitud, que se rellenaron con la mezcla hasta aproximadamente 1,5-2 cm del extremo superior y cubriendo el menisco con una capa de agua de 2-3 mm.

Las muestras contenían 10-50  $\mu$ g de proteína, sacarosa al 10% y azul de bromofenol al 0,1% (v/v) como colorante marcador del frente electroforético. Después de la aplicación de las muestras, la electroforesis se realizó primero a 1 mA/gel durante 20 min y luego a 3 mA/gel hasta que el azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel (aproximadamente 2 h). El proceso electroforético se realizó en un aparato para doce geles de SHANDOM (Inglaterra) con una fuente de alimentación (*power supply*) Vokam, modelo SE 2761, de SHANDOM.

#### II.D.4.2. Tinción de proteína en los geles de electroforesis

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se localizaron tiñéndolas por inmersión de los geles en una solución de azul brillante de Coomassie al 1% (p/v) en ácido acético al 7% (v/v). Tras 2 h de tinción, los geles se lavaron repetidas veces con una mezcla de metanol al 5% (v/v) y ácido acético al 7%, permaneciendo las bandas de proteína teñidas de azul mientras que el resto del gel se había decolorado.

Para determinaciones de la movilidad electroforética de las proteínas, se realizaba el densitograma de los geles según se describe en el apdo. II.D.5.3.

#### II.D.4.3. Localización de la actividad nitrato reductasa en los geles

La actividad MVH-nitrato reductasa se detectó en los geles de electroforesis por un método básicamente igual al descrito por Vega y Kamin (1977) para la nitrito reductasa. Los geles se sumergían en un tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) conteniendo metil viológeno 1,5 mM y ditionito sódico 23 mM y, después de 10 min a temperatura ambiente, éstos presentaban el color azul del metil viológeno reducido.

A continuación se transferían a tubos de ensayo que contenían nitrato potásico 10 mM en el mismo tampón, y se incubaban a 30°C. La actividad MVH-nitrato reductasa se mostraba como una banda incolora que aparecía al cabo de unos minutos, debida a la oxidación catalítica del metil viológeno por el nitrato. Los geles se transferían rápidamente a una solución de cloruro de trifeniltetrazolio al 2,5 % (p/v), el cual reacciona con el metil viológeno reducido dando lugar a un formazano rojo, insoluble y permanente. La actividad nitrato reductasa aparecía, por tanto, como una banda incolora en geles de color rojo.

#### II.D.4.4. Electroforesis en dodecil-sulfato sódico (SDS)

La electroforesis en presencia de SDS se llevó a cabo según el procedimiento de Weber y Osborn (1969), usando geles al 10% de acrilamida.

El tampón de los geles era fosfato sódico 0,2 M (pH 7,5) conteniendo SDS al 0,2% (p/v). El tampón electrolito se preparó diluyendo a la mitad con agua el tampón de los geles. Para preparar los geles se mezclaron 13,5 ml de una solución compuesta por acrilamida al 22,2% (p/v) y bis-acrilamida al 0,6% (p/v) con 15 ml del tampón de geles, 1,5 ml de persulfato amónico 65,7 mM y 45 µl de TEMED. Después de

eliminar los gases disueltos, se dejó polimerizar en tubos de 5 mm de diámetro interno y 10 cm de longitud, llenándolos hasta 1,5-2 cm del extremo superior y cubriendo el menisco con una capa de agua de 2-3 mm.

Las proteínas patrones se disolvieron en tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 7,0) a las concentraciones que se indican:  $\alpha$ -quimotripsinógeno, 0,5 mg/ml; ovalbúmina, 0,25 mg/ml; seroalbúmina, 0,25 mg/ml; y fosforilasa  $\alpha$ , 1,0 mg/ml. En otras ocasiones se usó un conjunto de proteínas patrones de PHARMACIA (Uppsala, Suecia) conteniendo fosforilasa  $b$ , seroalbúmina, ovalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de la tripsina de soja y  $\alpha$ -lactalbúmina. A muestras de 1 ml se les añadió 0,1 ml de tampón fosfato sódico 0,1 M (pH 7,0) con SDS al 10% (p/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol al 10% (p/v), y se calentaron a 100°C durante 5 min. Una vez enfriadas, se les añadió sacarosa al 10% y azul de bromofenol al 0,1% (v/v). Se aplicaron 10  $\mu$ l de cada muestra a los correspondientes geles, y se desarrolló la electroforesis a temperatura ambiente, primero a 4 mA/gel durante 30 min y luego a 8 mA/gel hasta que el marcador electroforético alcanzó el extremo inferior del gel ( $\approx$ 5 h).

El aparato empleado era el mismo que el de la electroforesis analítica (apdo. II.D.4.1.). La tinción de las proteínas se realizó como se describe en el apdo. II.D.4.2.

#### II.D.4.5. Electroforesis en gradiente de concentración de acrilamida

Para la determinación del peso molecular de la nitrato reductasa, se realizó una electroforesis en gradiente de concentración de acrilamida (Margolis y Wrigley, 1975)

Se usó como gel una placa disponible comercialmente de poliacrilamida con un gradiente de acrilamida desde el 4 hasta el 30% (p/v). Como referencia se usó un conjunto de proteínas patrones de PHARMACIA (Uppsala, Suecia) conteniendo tiroglobulina, ferritina, catalasa, lactato deshidrogenasa y seroalbúmina. El proceso electroforético se realizó a 8°C en un aparato para electroforesis preparativa Ultraphor<sup>R</sup> de COLORA (Lorch, R.F.A.). Los reservorios de los electrodos contenían un total de 10 l de Tris 90 mM, ácido bórico 80 mM y EDTA 20 mM (pH 8,4).

Los geles se equilibraron al principio a 125 V durante 15 min, y a continuación se aplicaron las muestras conteniendo 5 µg de cada estándar y/o 5-15 µg de nitrato reductasa. Se realizó una preelectroforesis durante 30 min a 75 V, y seguidamente se elevó el voltaje a 500 V continuándose la electroforesis en estas condiciones durante unas 5 h.

La tinción de las proteínas con azul de Coomassie se realizó como se describe en el apdo. II.D.4.2.

### II.D.5. *Determinaciones espectrofotométricas*

Con excepción del espectrofotómetro BAUSCH & LOMB, todos los demás aparatos eran del tipo de doble haz y podían ser empleados en medidas tanto dentro de la zona visible como de la ultravioleta.

#### II.D.5.1. Medidas de absorbancia

Las determinaciones colorimétricas se realizaron en espectrofotómetros BAUSCH & LOMB (U.S.A.) modelo Spectronic 100 o PYE UNICAM (Inglaterra) modelo SP8-100 UV, dotados ambos de lectura digital.

Las cinéticas enzimáticas se siguieron mediante aparatos PYE UNICAM modelos SP 1750 UV y SP8-100 UV con registrador incorporado. Las cubetas utilizadas eran de cuarzo, para medidas a longitudes de onda inferiores a 340 nm, o de cristal.

#### II.D.5.2. Espectros de absorción

Los espectros de absorción se registraron a temperatura ambiente en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, frente a un blanco adecuado como referencia. Se emplearon espectrofotómetros PYE UNICAM SP8-100 UV o AMINCO (U.S.A.)

modelo DW 2a. Antes de realizar un espectro se registraba la línea base del espectrofotómetro utilizado. La anchura del haz era siempre de 1,5 nm.

#### II.D.5.3. Densitogramas

Después de la electroforesis los densitogramas de los geles de poliacrilamida se realizaron en un espectrofotómetro PYE UNICAM SP8-100 UV, equipado con un densitómetro modelo 790826.

Los geles, una vez teñidos, se colocaban en un tubo de vidrio calibrado de 0,5 cm de diámetro interno, midiéndose la absorbancia a 640 nm, en el caso de proteína, o a 500 nm, en el caso de actividad nitrato reductasa, a lo largo del gel. Los geles se desplazaban a una velocidad de 0,2-0,4 mm/s. Otros parámetros utilizados fueron: intervalo de absorbancia, de 0 a 2; atenuadores, todos; rendija horizontal, 2 mm; rendija vertical derecha, 0,5 mm; rendija vertical izquierda, 0,1 o 0,2 mm; y temperatura ambiente.

#### II.D.5.4. Espectrofotometría de doble longitud de onda. Determinación del estado redox del citocromo $b_{557}$ de la nitrato reductasa

En 1951, B. Chance introdujo la espectrofotometría de doble longitud de onda, que permite la medida de pequeños

cambios de absorbancia en muestras altamente absorbentes y dispersantes. El fundamento se ilustra en la Fig. 3, y consiste en usar una única cubeta a través de la cual se pasan alternativamente dos rayos de luz monocromática de diferente longitud de onda. Siendo una técnica diferencial, se compara el cambio de absorbancia a una longitud de onda de interés —por ejemplo, la de máxima absorbancia del compuesto medido— con el cambio de absorbancia a una longitud de onda fija —usualmente un punto isosbético—. Para evitar interferencias con otros componentes, la longitud de onda de medida es determinada por el máximo de absorción más selectivo para el componente estudiado, y como longitud de onda de referencia se escoge el punto isosbético más próximo. Así, en el caso del citocromo  $b_{557}$  de la nitrato reductasa se escogió la longitud de onda correspondiente al pico  $\alpha$  (557 nm), y como referencia, 540 nm. De esta forma, se pueden seguir los cambios redox del citocromo  $b_{557}$  en base al incremento de absorbancia entre 557 y 540 nm, lo que permite efectuar cálculos cuantitativos acerca de la proporción entre las formas oxidada y reducida del citocromo.

Se utilizó un espectrofotómetro AMINCO (U.S.A.) modelo DW 2a de doble longitud de onda, equipado con un agitador magnético acoplado al portacubetas para la mezcla de los reactivos añadidos durante el experimento (ver apdo. III.E.3.).

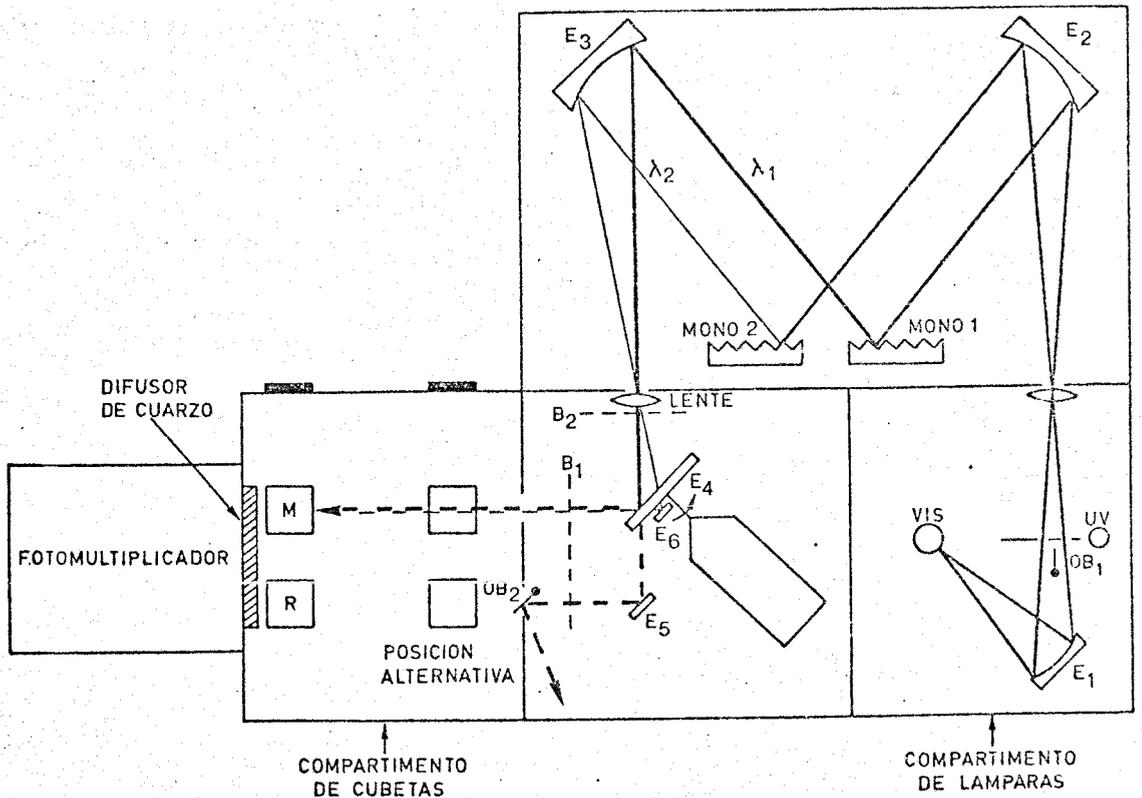


Figura 3. Diagrama óptico de la técnica de doble longitud de onda en un espectrofotómetro AMINCO modelo DW-2a. Similar a la técnica de haz dividido, la radiación de la lámpara de deuterio (UV) o de tungsteno (VIS) es enfocada por el espejo E<sub>1</sub> hacia la entrada del compartimento de monocromadores. El obturador OB<sub>1</sub> está totalmente abierto, y el haz dividido por las aberturas define dos rayos independientes. Después de la colimación por el espejo E<sub>2</sub> y la difracción por los monocromadores MONO 1 y MONO 2, los rayos  $\lambda_1$  y  $\lambda_2$  son enfocados por el espejo E<sub>3</sub> hacia el orificio de salida. Después los rayos pasan a través de una lente zoom y el balance de haz doble B<sub>2</sub> (B<sub>1</sub> es el balance de haz dividido). Ambos rayos bien pasan a través o bien son desviados por el espejo rotatorio E<sub>4</sub> (chopper) que está segmentado. Durante una mitad del ciclo, la luz del MONO 1 es reflejada por el espejo E<sub>5</sub> hacia una trampa de luz con ayuda del obturador OB<sub>2</sub>, y la luz del MONO 2 es reflejada por el espejo E<sub>6</sub> hacia la cubeta de muestra M. Durante la segunda mitad del ciclo, la luz del MONO 1 es reflejada por el espejo rotatorio E<sub>4</sub> hacia la cubeta de muestra M, mientras que la luz del MONO 2 es atrapada. La cubeta de referencia R no se utiliza en este caso.

#### II.D.6. *Determinaciones espectrofotofluorimétricas*

Todos los estudios fluorimétricos se realizaron en un espectrofotofluorímetro AMINCO-BOWMAN (U.S.A.) modelo SPF consistente en una unidad óptica, un fotomultiplicador y una fuente de alimentación, y al que se le había adaptado un registrador VARIAN-AEROGRAPH (U.S.A.) modelo F-100. Se emplearon cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

Teniendo en cuenta que todas las determinaciones fluorimétricas se centraron sobre el estudio de la flavina, siempre se usó como longitud de onda de excitación 450 nm, correspondiente a un máximo de absorbancia de los flavín nucleótidos. En otras ocasiones se usó 435 nm para la excitación. Los espectros de fluorescencia se efectuaban registrando la emisión de fluorescencia de la muestra dentro de un rango de longitudes de onda, usualmente desde la longitud de onda de excitación hasta 650 nm. Las medidas de fluorescencia se realizaban en base a la emisión de fluorescencia de las muestras a una determinada longitud de onda, generalmente correspondiente a un máximo de emisión, que en el caso de los flavín nucleótidos se encuentra a 530-535 nm.

#### II.D.7. *Titulaciones potenciométricas*

##### II.D.7.1. Determinación del potencial normal del citocromo *b*<sub>557</sub> de la nitrato reductasa

Las titulaciones redox del citocromo  $b_{557}$  se llevaron a cabo a temperatura ambiente bajo condiciones anaeróbicas en un espectrofotómetro de doble longitud de onda (ver apdo. II.D.5.4.), según la técnica propuesta por Dutton y Wilson (1974). Se utilizó una cubeta especial de cuarzo de 1 cm de paso de luz, cuyo esquema se representa en la Fig. 4.

A través de la cubeta conteniendo 3 ml de una solución de nitrato reductasa en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0) con EDTA 0,10 mM, se hizo pasar una corriente de  $N_2$  30 min antes de empezar la titulación y durante todo el tiempo que duró la misma. El  $N_2$  se hacía previamente pasar a través de una disolución de pirogalol en NaOH al 1% (p/v), para eliminar las trazas de oxígeno que pudiera llevar el gas. La mezcla de reacción contenía los siguientes mediadores redox, cada uno de ellos a una concentración final de 20  $\mu$ M: 3,6-diaminodurol ( $E_0'$ , pH 7 = +220 mV); fenazina metosulfato ( $E_0'$ , pH 7 = +80 mV); 1,2-naftoquinona ( $E_0'$ , pH 7 = +36 mV); y 2-hidroxi-1,4-naftoquinona ( $E_0'$ , pH 7 = -145 mV). Una solución de ditionito sódico 50 mM se usó para las titulaciones reductivas, y otra de ferricianuro potásico 50 mM, para las oxidativas. Después de cada adición de ditionito (o ferricianuro) se registraron los cambios de absorbancia a 557-540 nm, a la vez que se medía el potencial redox con un electrodo combinado Pt-Ag/AgCl INGOLD ( $E_0$ , a 25°C = +222 mV (Dutton, 1978)) conectado a un pH-metro METHROM-HERISAU (R.F.A.)

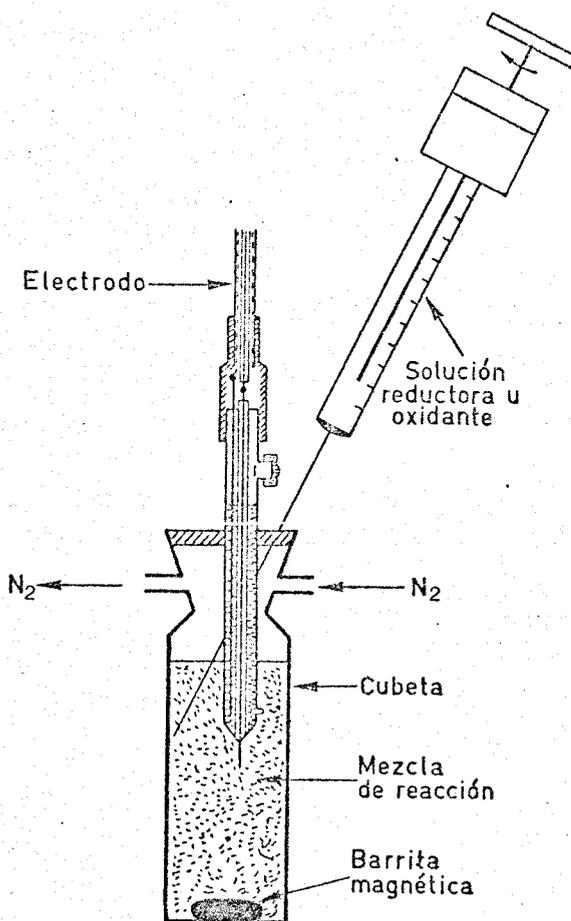


Figura 4. Sistema anaeróbico utilizado para la determinación del potencial redox del citocromo  $b_{557}$  de la nitrato reductasa. La cubeta empleada era de cuarzo y 1 cm de paso de luz. La microjeringa era de émbolo de rosca, adecuada para la adición de pequeñas alícuotas del agente oxidante o reductor.

modelo E-512. El electrodo se calibraba antes de cada titulación con una disolución saturada de quinhidrona a pH 7,0 { $E^{\circ}$ , pH 7,0 = +280 mV (Loach, 1973)}.

#### II.D.7.2. Determinación del potencial normal de los procesos de inactivación y reactivación de la nitrato reductasa

Las titulaciones redox de los procesos de inactivación y reactivación de la nitrato reductasa se llevaron a cabo a 30°C bajo condiciones anaeróbicas, en una cubeta cilíndrica y termostatzada de 6 ml de capacidad con agitación magnética (Fig. 5).

La mezcla de reacción, conteniendo 4 ml de una solución de nitrato reductasa en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), se gaseó continuamente con  $N_2$  desde 20 min antes de comenzar la titulación y durante todo el tiempo que duró la misma. La corriente de  $N_2$  se hizo pasar por una disolución de pirogalol en NaOH al 1% (p/v) para asegurar la ausencia de oxígeno. El potencial redox se midió con un pH-metro equipado con un electrodo combinado de Pt-Ag/AgCl previamente equilibrado con quinhidrona (ver apado. II.D.7.1.). Se usaron los siguientes mediadores redox, cada uno a una concentración final de 25  $\mu$ M: 1,4-naftoquinona ( $E^{\circ}$ , pH 7 = +36 mV), azul de metileno ( $E^{\circ}$ , pH 7 = +11 mV), ácido índigo-tetrasulfónico ( $E^{\circ}$ , pH 7

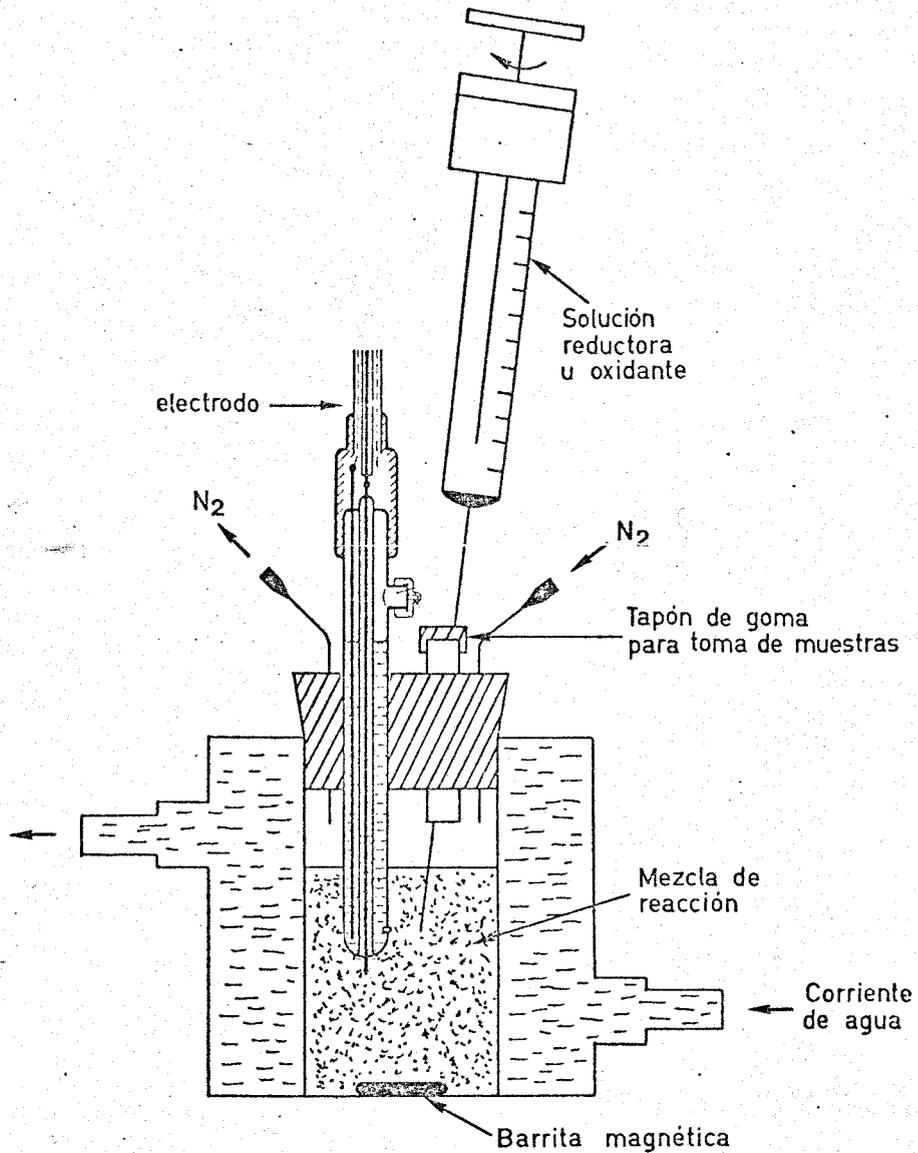


Figura 5. Sistema anaeróbico utilizado para la titulación redox de los procesos de inactivación y reactivación de la nitrato reductasa. Alrededor de la mezcla de reacción se hacía circular una corriente de agua a  $30^{\circ}\text{C}$ . La microjeringa era de émbolo de rosca, adecuada para la adición de pequeñas alícuotas del agente oxidante o reductor. La toma de muestras se realizaba con una jeringa a través de un pequeño taponcito de goma.

= -46 mV) y 2-hidroxi-1,4-naftoquinona ( $E_0$ , pH 7 = -139 mV) para la determinación del potencial de inactivación, y 2,6-diclorofenolindofenol ( $E_0$ , pH 7 = +217 mV), 1,2-naftoquinona ( $E_0$ , pH 7 = +143 mV), N-metilfenazina metosulfato ( $E_0$ , pH 7 = +80 mV) y azul de metileno para la titulación del proceso de reactivación. Una solución de ditionito sódico 50 mM y otra de ferricianuro potásico 50 mM se usaron para ajustar el potencial redox de la mezcla de reacción.

#### II.D.8. *Resonancia paramagnética del electrón (EPR)*

Los espectros de EPR de la nitrato reductasa se registraron en un instrumento BRUCKER, con accesorio de helio para bajas temperaturas. La temperatura fue de 15°K; la amplitud de modulación, 16,1 Gauss; la frecuencia 9,43 GHz (= giga hertz). Los valores de  $g$  escritos a lo largo del espectro en puntos interesantes fueron determinados por computadora.

#### II.D.9. *Microscopía electrónica*

Para los estudios al microscopio electrónico se usó una preparación de nitrato reductasa conteniendo 0,9mg/ml en tampón fosfato potásico 10 mM (pH 7,0) con DTE 0,15 mM, EDTA 0,10 mM y FAD 20  $\mu$ M. El enzima se redujo con unos cristallitos de NADH y se guardó a -20°C. Inmediatamente antes de

usarla, la solución enzimática se diluyó unas diez veces con fosfato potásico 10 mM (pH 7,0) y entonces se realizó la tinción con acetato de uranilo al 2%, según el método descrito por Valentine *et al* (1968). En otras ocasiones, el enzima se fijó con formaldehído antes de teñirlo. A continuación se realizaron las micrografías electrónicas del espécimen de enzima negativamente teñido en un microscopio electrónico PHILIPS EM 400. La simetría de rotación de la molécula de enzima se determinó por el método de superposición óptica (Markham *et al*, 1963). El enzima también se visualizó empleando la técnica *sandwich*, consistente en fijar una molécula de enzima entre dos finas láminas de carbón (Beuscher *et al*, 1974).

#### II.D.10. *Establecimiento de condiciones anaeróbicas y de la presión parcial de oxígeno*

Para la obtención de una atmósfera determinada distinta a la normal, se utilizó un aparato MANIFOLD que permitía realizar con facilidad ciclos sucesivos de evacuado de la atmósfera inicial y llenado con el gas o la mezcla de gases deseados en cada caso a un total de doce tubos al mismo tiempo.

Las muestras de 0,5-1 ml se colocaban en tubos de 3,5 ml de capacidad con tapadera de goma y capuchón de rosca PIERCE (U.S.A.), los cuales se conectaban a las salidas del

aparato mediante una aguja hipodérmica.

Las soluciones se evacuaron durante 3 min con una bomba de alto vacío WELCH (U.S.A.) modelo 1405 para eliminar el aire disuelto. Posteriormente se rellenaron bien con argón —para establecer una atmósfera anaeróbica— o bien con una mezcla de argón/O<sub>2</sub> en proporción conocida —para establecer una atmósfera con una determinada presión parcial de oxígeno—, y se mantuvieron en estas condiciones durante 30 s con agitación ocasional. El proceso de vaciado/llenado se repitió tres veces. El argón, cuando se quería establecer condiciones anaeróbicas se hacía pasar a través de un catalizador BASF (R.F.A.) R3-11 calentado a 60°C, para eliminar cualquier traza de oxígeno. La composición de la mezcla argón/O<sub>2</sub> se establecía controlando el flujo de cada uno de los dos gases con un medidor de flujos gaseosos MANOSTAT (U.S.A.) modelo 100S.

La toma de muestras y la adición de reactivos se llevó a cabo empleando jeringas herméticas (*gas tight*) HAMILTON (Suiza).

#### II.D.11. *Medidas del pH*

El pH de las disoluciones se determinó con pH-metros BECKMAN (U.S.A.) modelo Expandomatic SS2 o METHROM-HERISAU (U.S.A.) modelo E-512, ambos provistos de escala expandida.

#### II.D.12. *Eliminación de sales y moléculas pequeñas*

Las sales y otras moléculas de pequeño tamaño, como DTE, nucleótidos, EDTA, etc., se eliminaron generalmente por filtración a través de columnas de Sephadex G-25 (medium) cuyo volumen vacío había sido previamente determinado con azul dextrano. En otras ocasiones, las soluciones enzimáticas se sometían a diálisis en bolsas de celulosa regenerada Visking (SERVA, U.S.A.) previamente hervidas en una mezcla de  $\text{NaHCO}_3$  al 1% (p/v) y EDTA al 0,01% (p/v) durante 30 min, y lavadas posteriormente con agua destilada.

#### II.E. REACTIVOS

Los flavín nucleótidos, adenín nucleótidos, Tris, EDTA, azul dextrano, azul de Coomassie, azul-Sefarosa CL-6B, fenazina metosulfato y pHMB, así como las proteínas alcohol deshidrogenasa, catalasa, fosforilasa  $\alpha$ ,  $\alpha$ -quimotripsinógeno y ureasa se obtuvieron de SIGMA (St. Louis, U.S.A.). Los piridín nucleótidos y el citocromo  $c$ , de BOEHRINGER (Manheim, R.F.A.). El DTE, viológenos, TEMED, ovalbúmina, seroalbúmina, ferritina y fibrinógeno, de SERVA (Heidelberg, R.F.A.). 3,6-diaminodurool, de FLUKA (Buchs, Suiza). 1,2-naftoquinona, 1,4-naftoquinona, 2-hidroxi-1,4-naftoquinona y bis-acrilamida, de ALDRICH (Beerse, Bélgica). El Bio-Gel A-1.5 m era de BIORAD LABORATORIES (U.S.A.). El Sephadex G-25 procedía

de PHARMACIA (Uppsala, Suecia) y los geles con gradiente de acrilamida, así como el conjunto proteínas estándares usadas como referencia en electroforesis eran de PHARMACIA (Freiburg, R.F.A.). El sulfato de estreptomicina se obtuvo de Cía. Española de Penicilina. Las perlas de vidrio para la rotura de células eran de B. BRAUN (Melsungen, R.F.A.). Las sales empleadas en mayor cantidad en los medios de cultivo, como el nitrato potásico, el cloruro sódico y los fosfatos, eran de PANREAC (España). El resto de los productos utilizados eran de grado analítico y procedían de MERCK (Darmstadt, R.F.A.).

El agua destilada se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA (España). El agua utilizada en los cultivos a gran escala se desionizó mediante un desmineralizador SETA (España) modelo D400. Para los cultivos estériles se usó agua destilada.

Los gases utilizados, anhídrido carbónico, nitrógeno, argon y oxígeno eran de alta pureza y fueron adquiridos a la Sociedad Española del Oxígeno (España).

### III. RESULTADOS

### III.A. PURIFICACION HASTA HOMOGENEIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Ankistrodesmus braunii*.

#### III.A.1. Método de purificación

La nitrato reductasa de *A. braunii* se purificó a partir de un extracto crudo libre de células, que se preparó según se describe en Materiales y Métodos (apdo: II.B.1.).

El tampón utilizado a lo largo de todo el proceso de purificación, fosfato potásico 10 mM (pH 7,0) conteniendo DTE 0,15 mM, EDTA 0,10 mM y FAD 20  $\mu$ M, se denominará abreviadamente tampón estándar. En relación con la naturaleza del tampón, se escogió el fosfato por presentar un alto poder amortiguador en la zona próxima a pH 7, y ventajas muy significativas respecto a otros compuestos ensayados, como el Tris, en lo concerniente a la adsorción de la nitrato reductasa a la azul-Sefarosa (De la Rosa *et al*, 1980a). Por otra parte, el FAD, cofactor fisiológico de la nitrato reductasa, es un efectivo protector de la actividad diaforasa del enzima (Zumft *et al*, 1970); el DTE protege los grupos sulfhidrilos de la proteína; y el EDTA impide la acción desnaturizante de los metales. Así pues, al complementar el tampón con estos compuestos se minimizan las pérdidas de actividad del enzima durante la purificación.

Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperaturas comprendidas entre 0 y 4°C.

### III.A.1.1. Tratamiento con sulfato de estreptomicina

Al extracto crudo, alrededor de 700 ml, obtenido a partir de 100 g (peso fresco) de células, se le añadió lentamente 70 ml de sulfato de estreptomicina 0,1 M (pH 7,0). Después de 10 min a 0°C con agitación continua, se mantuvo la suspensión en hielo 3 h más para completar la precipitación y se centrifugó a 17.000 x g durante 30 min. El sedimento se desechó, y se recogió el sobrenadante como material de partida para la cromatografía de afinidad I.

### III.A.1.2. Cromatografía de afinidad I

La solución enzimática obtenida en el paso anterior (140-150 unidades de actividad nitrato reductasa) se pasó lentamente a través de una columna (3 x 15 cm) de azul-Sefarosa equilibrada con el tampón estándar. Una vez adsorbida la nitrato reductasa se procedió al lavado con 500 ml del mismo tampón, eliminándose gran cantidad de proteínas no adsorbidas por el ligando. El tampón de lavado se suplementó con KCl 0,1 M para incrementar su fuerza iónica, y se eliminaron otras proteínas débilmente unidas a la azul-Sefarosa. Finalmente, la columna se reequilibró con 250 ml del tampón estándar, y la subsiguiente aplicación de una solución de NADH 0,5 mM eluyó la mayoría de los enzimas dependientes del piridín nucleótido, incluyendo la nitrato reductasa. Un perfil típico de la cromatografía en azul

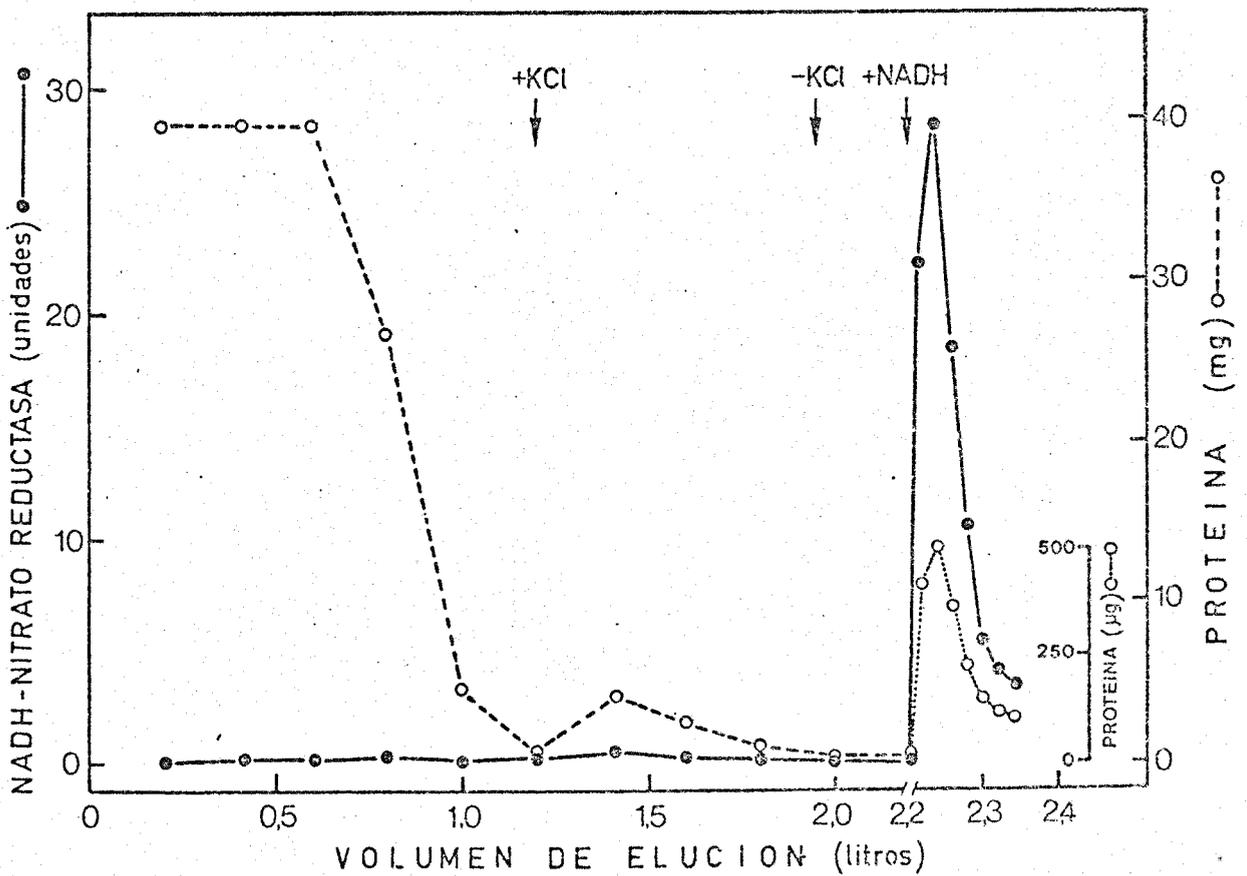


Figura 6. Cromatografía de afinidad en azul-Sefarosa de la nitrato reductasa de *A. braunii*. 710 ml del sobrenadante obtenido después del tratamiento con sulfato de estreptomicina, preparado a partir de 100 g (peso fresco) de células según se describe en Materiales y Métodos, se pasaron por una columna (3x15 cm) de azul-Sefarosa previamente equilibrada con el tampón estándar. A continuación se lavó la columna con el mismo tampón. Las flechas indican los puntos de adición (+) o de remoción (-) de KCl 0,1 M al tampón de lavado, así como la adición final de NADH 0,5 mM. Se recogieron fracciones de 10 ml con un flujo de 50 ml/h, en las que se determinó la actividad NADH-nitrato reductasa (●) y el contenido en proteína (○). Similar distribución de la actividad se observó cuando ésta se ensayó con NADPH como donador de electrones.

-Sefarosa de la nitrato reductasa de *A. braunii* aparece en la Fig. 6, donde se observa cómo el enzima es eluido por el NADH junto con un pico de proteínas.

Las fracciones con mayor actividad nitrato reductasa se coleccionaron y la solución resultante (120-150 ml) se dializó exhaustivamente frente a 5 l del tampón estándar para eliminar el NADH. En esta fase de la purificación la solución enzimática tenía una actividad específica de 40-50 unidades/mg de proteína, con un factor de purificación de 900 veces y una recuperación del 70% aproximadamente respecto al extracto crudo (Tabla I).

### III.A.1.3. Cromatografía de afinidad II

La solución enzimática dializada procedente del paso anterior se aplicó lentamente a otra columna (1,2 x 16 cm) de azul-Sefarosa equilibrada con el tampón estándar y, después de la adsorción, se lavó con 50 ml de tampón. La aplicación final de un gradiente lineal de NADH de 0 a 0,5 mM en el mismo tampón, dió lugar a la elución de todos los enzimas retenidos en la columna en base a su afinidad por el NADH, lo que condujo a una mejor resolución de las diferentes proteínas. El perfil de elución de la actividad nitrato reductasa se muestra en la Fig. 7, apreciándose una actividad específica prácticamente constante a lo largo del pico. El NADH no se pudo detectar hasta que se eluyó todo el enzima, probablemente debido a una actividad NADH

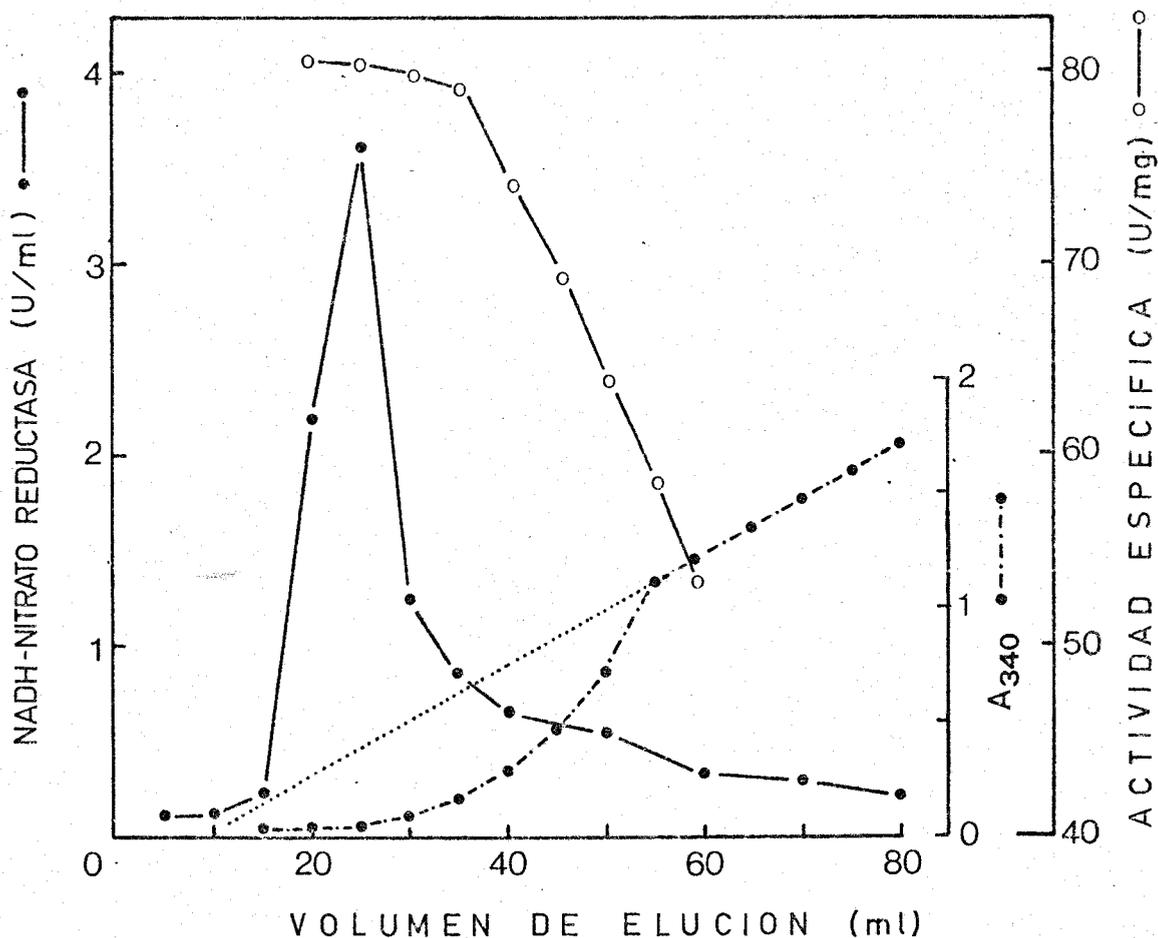


Figura 7. Perfil de elución con un gradiente lineal de NADH de la nitrato reductasa adsorbida a una columna de azul-Sefarosa. 150 ml de la solución enzimática obtenida después de la cromatografía de afinidad I (ver texto), se aplicaron a una columna (1,2x16 cm) de azul-Sefarosa equilibrada con el tampón estándar. Después de un breve lavado de la columna con el mismo tampón, se llevó a cabo la elución de la nitrato reductasa con un gradiente lineal de NADH desde 0 hasta 0,5 mM. Se recogieron fracciones de 2 ml con un flujo de 15 ml/h. Similar distribución se observó para la actividad NADPH-nitrato reductasa, manteniéndose la relación de actividades NADH-/NADPH-nitrato reductasa entre 1,1 y 1,3 a lo largo del pico.

-oxidasa asociada al enzima.

El conjunto de fracciones con mayor actividad nitrato reductasa se concentró por adición lenta de sulfato amónico sólido hasta el 55% (p/v) de saturación. Después de 30 min a 0°C con agitación continua, la proteína precipitada se recogió por centrifugación a 27.000 x *g* durante 20 min, y se disolvió en un volumen mínimo de tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,0) conteniendo DTE 0,15 mM, EDTA 0,10 mM y FAD 20 µM. Se añadió glicerol hasta el 40% (v/v) de concentración final y la solución enzimática resultante se guardó a -20°C durante varios meses sin pérdidas significativas de actividad.

El procedimiento de purificación aquí descrito, y resumido en la Tabla I, permite obtener 0,6 mg aproximadamente de nitrato reductasa a partir de 100 g (peso fresco) de células, con un factor de purificación de 1.600 veces y una recuperación final del 32%. La actividad específica de las preparaciones obtenidas llegó a alcanzar valores de hasta 80 U/mg, lo cual corresponde a un número de recambio (*turnover number*) de 37.392 min<sup>-1</sup>.

El complejo enzimático nitrato reductasa de *A. braunii* así purificado presenta actividad total desde el NAD(P)H hasta el nitrato, a la vez que las otras dos actividades parciales asociadas a dicho complejo. Por una parte, es capaz de reducir citocromo *c*, ferricianuro, DCPIP etc, con NAD(P)H como donador de

TABLA I

PURIFICACION DEL COMPLEJO ENZIMATICO NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA DE *A. braunii*

Fracción	Volumen Proteína		Actividad total (U)	Recuperación (%)	Actividad específica (U/mg)	Purificación
	(ml)	(mg)				
Extracto crudo	730	2.848	142	100	0,05	1
Sobrenadante de estreptomina	710	1.425	151	106	0,11	2
Cromatografía de afinidad I	150	2,24	96	68	42,87	859
Cromatografía de afinidad II	2,3	0,57	45	32	78,50	1.570

El procedimiento de purificación, a partir de 100 g (peso fresco) de células, se describe en el texto. La actividad NADH-nitrato reductasa se ensayó según se indica en Materiales y Métodos, después de su reactivación con ferricianuro. Para ello, el enzima se incubó durante 1 min a 0°C en presencia de 60 nmol de ferricianuro potásico y 100 µmol de tampón Tris-HCl (pH 7,5), y a continuación se añadieron el piridín nucleótido reducido y el nitrato para completar el sistema de ensayo estándar.

electrones, haciendo uso de la primera actividad del complejo. Por otra parte, usando viológenos y flavinas reducidas con ditionito es capaz de reducir nitrato a nitrito, para lo cual sólo requiere la mitad terminal.

### III.A.2. *Criterio de pureza. Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida.*

La preparación de nitrato reductasa purificada y concentrada con sulfato amónico, después de dializada, se sometió a electroforesis analítica en geles de poliacrilamida, según se indica en Materiales y Métodos.

La Fig. 8A muestra una fotografía del gel teñido para proteína, así como su densitograma, obtenido después de realizar una electroforesis a pH 8,3 de la nitrato reductasa purificada en geles de poliacrilamida al 5%. En ella se observa la presencia de una sola banda de proteína, la cual se comprobó que correspondía a la nitrato reductasa al presentar reacción positiva para la tinción MVH-nitrato reductasa, según muestra la Fig. 8B. Por tanto, puede afirmarse que dentro de los valores de error del método la proteína obtenida se encuentra en estado homogéneo.

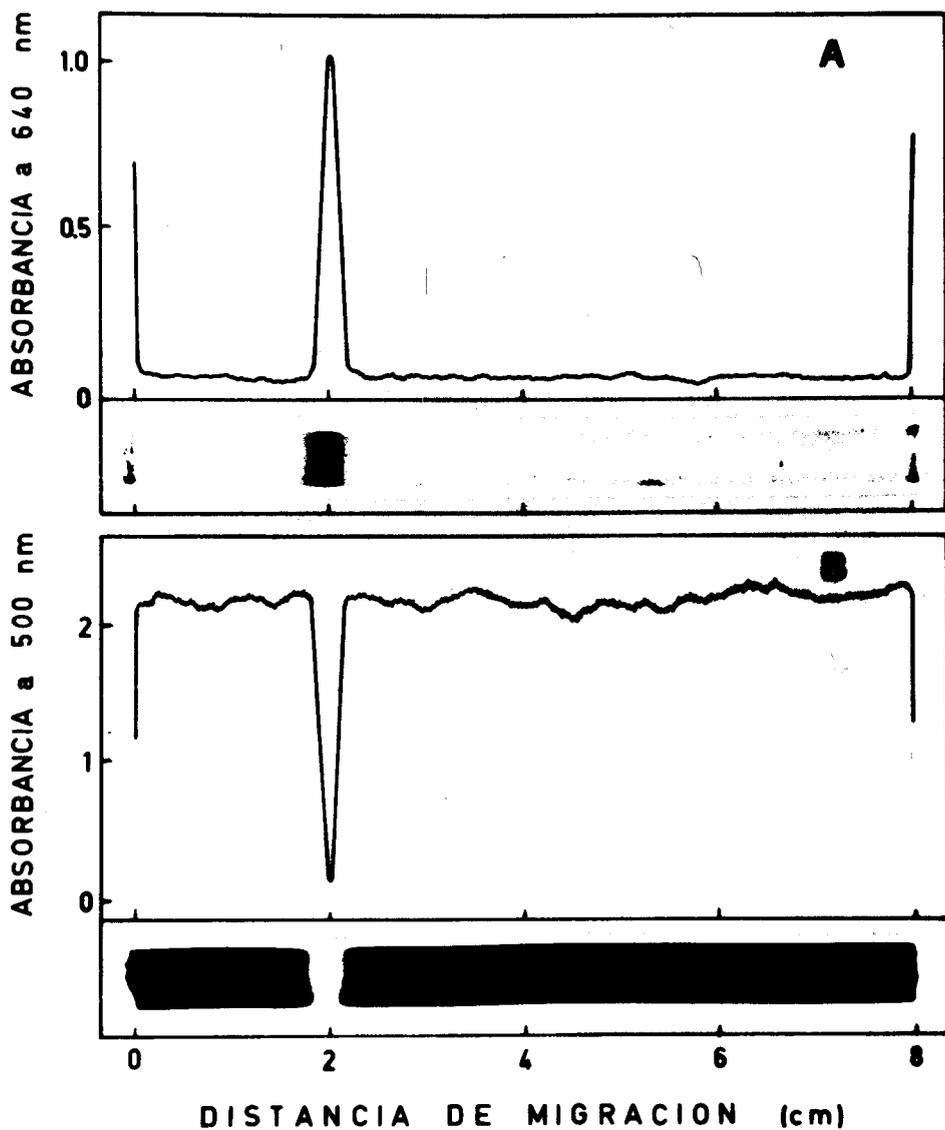


Figura 8. *Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida de la nitrato reductasa purificada.* Muestras de 20  $\mu\text{g}$  de proteína se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 5% durante 2 h, en presencia de tampón Tris-glicina (pH 8,3). (A), gel teñido para proteína; y (B), gel teñido para actividad MVH-nitrato reductasa. En la parte superior de cada gel se presenta el correspondiente densitograma. Los detalles del proceso electroforético se describen en Materiales y Métodos.

### III.B. ESTUDIOS CATALITICOS Y CINETICOS DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. braunii*

#### III.B.1. *pH óptimo*

La Fig. 9 pone de manifiesto la dependencia de la actividad nitrato reductasa de *A. braunii* respecto al pH, en un intervalo comprendido entre 3,5 y 10,5, y respecto a la naturaleza del tampón. La actividad total ensayada con NADH como donador de electrones (NADH-nitrato reductasa) presenta un pH óptimo de trabajo igual a 7,5, siendo prácticamente igual en presencia de tampón fosfato que de Tris.

#### III.B.2. *Temperatura óptima*

La actividad NADH-nitrato reductasa se ensayó a distintas temperaturas en el intervalo comprendido entre 10 y 60°C. Se observa un marcado aumento de la actividad con la temperatura, alcanzándose un máximo a 35°C a partir del cual la actividad disminuye, lo que probablemente se debe a la desnaturalización térmica de la proteína (Fig. 10, recuadro interno).

En la Fig. 10 se muestra la representación de Arrhenius de las velocidades máximas en función de la temperatura. Se observa que los puntos obtenidos obedecen, en el intervalo de 10 a 30°C, a una línea recta definida por la ecuación:

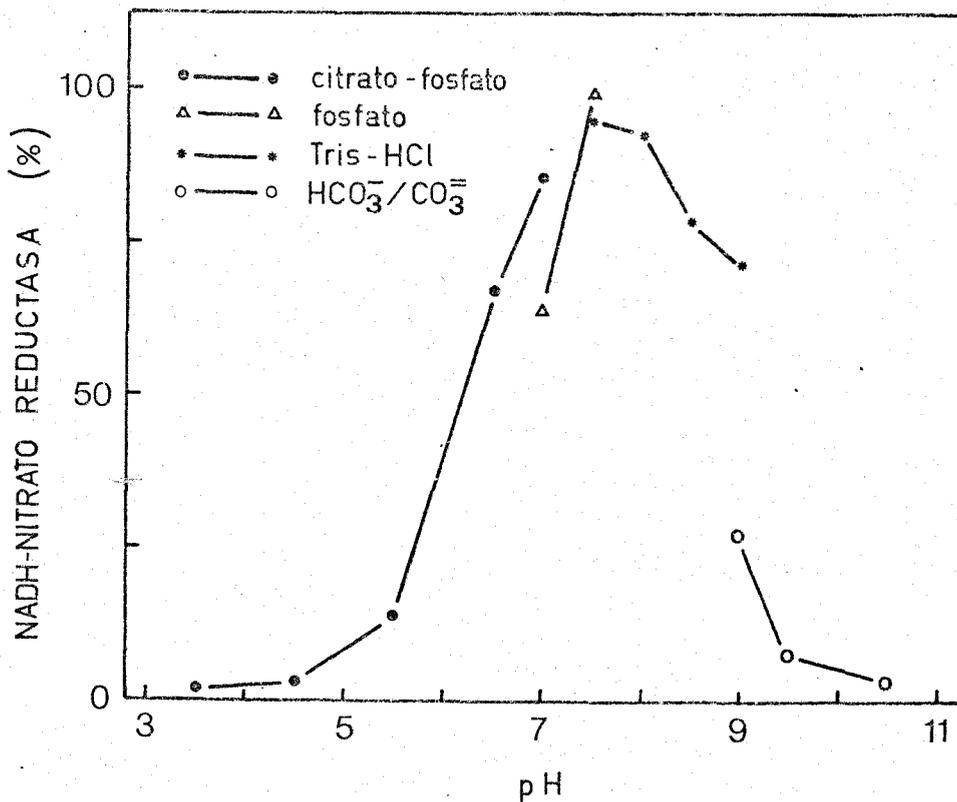


Figura 9. pH óptimo de la actividad NADH-nitrato reductasa. La actividad NADH-nitrato reductasa se ensayó según el procedimiento estándar indicado en Materiales y Métodos, excepto que en cada caso se usaron los tampones indicados a una concentración final de 100 mM.

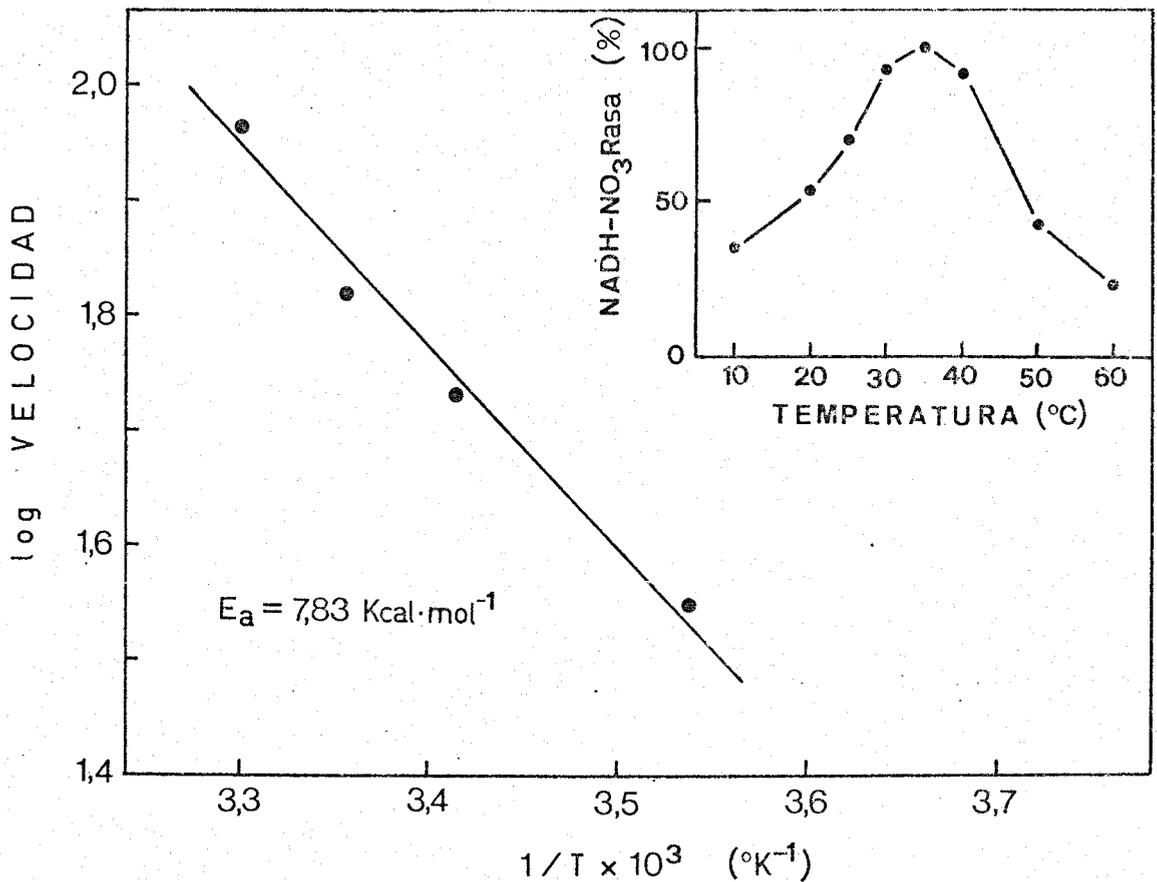


Figura 10. Temperatura óptima para el ensayo de la actividad NADH-nitrato reductasa. La actividad NADH-nitrato reductasa se ensayó a las temperaturas indicadas según se describe en Materiales y Métodos. En el recuadro interno se representa la actividad obtenida a cada temperatura, mientras que en la figura externa se representa el logaritmo de la velocidad de la reacción enzimática frente al inverso de la temperatura en °K.

$$\log V_{\max} = \log A - \frac{E_a}{2,303 \cdot R} \cdot \frac{1}{T}$$

donde  $V_{\max}$  es la velocidad máxima de la reacción a la temperatura  $T$ ,  $A$  es una constante,  $E_a$  es la energía de activación de la reacción y  $R$  es la constante de los gases (1,987 cal/°K·mol). La pendiente de esta recta es  $-E_a/2,303R$ , pudiéndose por tanto calcular el valor de la  $E_a$  a partir de la gráfica de Arrhenius. Una energía de activación igual a 7,83 Kcal·mol<sup>-1</sup> se calculó para la reacción enzimática catalizada por la nitrato reductasa.

### III.B.3. Valores de $K_m$ para los diferentes sustratos del enzima

Una serie de representaciones de Wolf de las velocidades iniciales de reacción a concentraciones variables de sustrato se realizó para estudiar la afinidad de los sustratos por el complejo enzimático nitrato reductasa. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla II.

La  $K_m$  para el nitrato a concentración 'infinita' del piridín nucleótido reducido, NADH o NADPH, es 0,15 mM, la cual es ligeramente superior a la encontrada por Ahmed y Spiller (1976) para este enzima y por Hewitt (1975) para otras nitrato reductasas. Es importante señalar que cuando el metil viológeno reducido con ditionito se usa como donador de electrones, el valor de la  $K_m$  para el nitrato se hace mayor, alrededor de 0,50 mM.

TABLA II

VALORES DE  $K_m$  PARA LOS SUSTRATOS DEL COMPLEJO ENZIMATICO  
NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA

Actividad ensayada	Sustrato	$K_m$ ( $\mu M$ )
NADH-nitrato reductasa	NADH	13
	$NO_3^-$	150
NADPH-nitrato reductasa	NADPH	23
	$NO_3^-$	150
MVH-nitrato reductasa	MVH	2
	$NO_3^-$	500
BVH-nitrato reductasa	BVH	2
FMNH <sub>2</sub> -nitrato reductasa	FMNH <sub>2</sub>	200
FADH <sub>2</sub> -nitrato reductasa	FADH <sub>2</sub>	300
NADH-citocromo <i>c</i> reductasa	NADH	13
	citocromo <i>c</i>	50

Las actividades enzimáticas se ensayaron según se indica en Materiales y Métodos, excepto que el sustrato cuya  $K_m$  se trataba de medir se añadía a distintas concentraciones no saturantes. Los datos de velocidad inicial ( $v_0$ ) obtenidos se representaron en función de la concentración de sustrato (S) utilizada en cada caso (representación de Wolf, S/v frente a 1/S) para determinar el valor de la  $K_m$ .

Los valores de  $K_m$  para los piridín nucleótidos reducidos son: 13  $\mu\text{M}$  para el NADH y 23  $\mu\text{M}$  para el NADPH, similar a los previamente publicados para este enzima (Ahmed y Spiller, 1976). Esta mayor afinidad del enzima por el NADH respecto al NADPH justifica el hecho de que siempre los valores de actividad nitrato reductasa sean mayores con NADH que con NADPH (Figs. 6 y 7).

Por otra parte, MVH, BVH, FMNH<sub>2</sub> y FADH<sub>2</sub> también son capaces de donar electrones para la reducción catalítica de nitrato a nitrito (actividad terminal). Los viológenos reducidos son donadores mucho más efectivos,  $K_m$  alrededor de 2  $\mu\text{M}$ , que los compuestos flavínicos, con valores de  $K_m$  casi 100 veces superior (Tabla II).

#### III.B.4. *Inhibidores de las distintas actividades del enzima*

El pHMB, reactivo típico de grupos sulfhidrilos, a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  inhibe de forma prácticamente total la actividad NAD(P)H-citocromo *c* reductasa, y consecuentemente la actividad NAD(P)H-nitrato reductasa, sin afectar de forma significativa la mitad terminal del complejo (Tabla III). Por el contrario, el cianuro y la azida, compuestos quelantes de metales, inhiben la actividad MVH-nitrato reductasa, mientras que la actividad NAD(P)H-citocromo *c* reductasa permanece alta incluso cuando la concentración del inhibidor es 0,5 mM (Tabla III). Es-

TABLA III

EFFECTO DE VARIOS INHIBIDORES SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA

Inhibidor	Concentración ( $\mu$ M)	Actividad (%)		
		NADH-NO <sub>3</sub> Rasa	NADH-cit $\sigma$ Rasa	MVH-NO <sub>3</sub> Rasa
Ninguno	—	100	100	100
pHMB	1	42	7	96
pHMB	10	5	3	85
KCN	50	18	97	13
KCN	500	6	98	2
NaN <sub>3</sub>	50	42	104	19
NaN <sub>3</sub>	500	10	105	3

Las actividades enzimáticas se determinaron según se describe en Materiales y Métodos, incluyendo en la mezcla de reacción el inhibidor correspondiente a la concentración indicada. Similares resultados se obtuvieron cuando la actividad enzimática se ensayó con NADPH como donador de electrones en vez de con NADH.

tos resultados están básicamente de acuerdo con los obtenidos en otras nitrato reductasas (Losada 1976a; Hewitt, 1975).

### III.B.5. *Protección específica por NADH frente a la inhibición por pHMB*

Los resultados de la Tabla IV muestran que el NADH protege específicamente a la nitrato reductasa de *A. braunii* frente a la inhibición por pHMB. Por el contrario, el FAD, efectivo protector del enzima de espinaca (Relimpio *et al*, 1971) frente al pHMB, no protege al enzima de *A. braunii* (Tabla IV) ni al de *Chlorella fusca* (Vega *et al*, 1972). El nitrato y el piridín nucleótido oxidado tampoco son capaces de proteger al enzima.

Estos resultados sugieren que las actividades dependientes de piridín nucleótido de la nitrato reductasa requieren grupos sulfhidrilos libres, y que el NADH interactúa directamente con los grupos -SH.

### III.B.6. *Mecanismo cinético en el estado estacionario (steady state) de la actividad NADH-nitrato reductasa*

TABLA IV

EFFECTO PROTECTOR ESPECIFICO DEL NADH FRENTE A LA INHIBICION POR pHMB DE LA ACTIVIDAD NADH-NITRATO REDUCTASA

Sistema de preincubación	Actividad relativa (%)
Enzima	100
Enz + pHMB	8
Enz + pHMB + NADH	67
Enz + pHMB + NAD <sup>+</sup>	6
Enz + pHMB + FAD	11
Enz + pHMB + NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6

La nitrato reductasa (0,096 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 1 ml con 0,1 mmol de tampón Tris-HCl (pH 7,5) y, donde se indica, 12 nmol de pHMB, 30 nmol de NADH, NAD<sup>+</sup> o FAD y 1 μmol de nitrato. Después de 7 min a temperatura ambiente, la actividad NADH-nitrato reductasa se midió añadiendo 10 μl de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo estándar.

### III.B.6.1. Determinación de las velocidades iniciales a diferentes concentraciones de los sustratos.

El estudio del mecanismo cinético de la nitrato reductasa de *A. braunii* se llevó a cabo midiendo las velocidades iniciales de oxidación por nitrato de NADH, a concentraciones variables de ambos sustratos. La representación de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) de los resultados obtenidos se muestra en la Fig. 11 con NADH variable y a concentraciones fijas de nitrato, y en la Fig. 12 con nitrato variable a concentraciones fijas de NADH, obteniéndose en ambos casos una serie de líneas paralelas.

De acuerdo con Cleland (1963a), dicha distribución de líneas paralelas corresponde a un mecanismo catalítico de tipo Ping-Pong, el cual viene definido por la siguiente ecuación:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot \{NADH\} \cdot \{NO_3\}}{K_{mNADH} \cdot \{NO_3\} + K_{mNO_3} \cdot \{NADH\} + \{NADH\} \cdot \{NO_3\}} \quad (1)$$

donde  $v_0$  es la velocidad inicial de la reacción enzimática,  $V_{\max}$  es la velocidad máxima a concentración 'infinita' de ambos sustratos,  $K_{mNADH}$  y  $K_{mNO_3}$  representan las constantes de Michaelis para el NADH y el nitrato, respectivamente, y  $\{NADH\}$  y  $\{NO_3\}$  representan las concentraciones de cada uno de los sustratos.

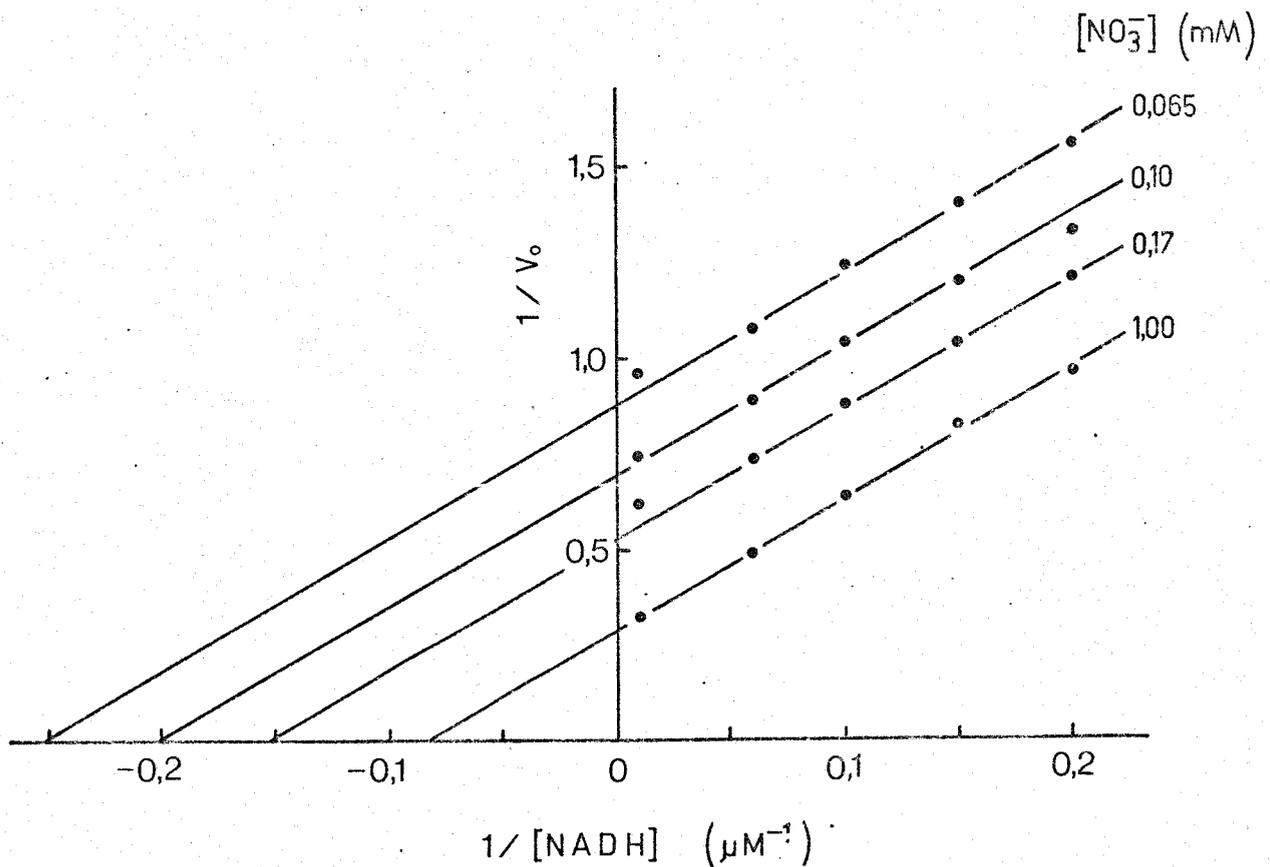


Figura 11. Representación de dobles recíprocos de la velocidad inicial de la reacción catalizada por la nitrato reductasa frente a la concentración de NADH a concentraciones fijas de nitrato. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: 100  $\mu$ mol de Tris-HCl (pH 7,5), 10  $\mu$ g de nitrato reductasa purificada y NADH y nitrato a las concentraciones indicadas. Los cambios de absorbancia a 340 nm se siguieron a 30°C en cubetas de 1 cm de paso de luz. Las velocidades iniciales ( $v_0$ ) se expresan como  $\mu$ mol de NADH oxidado por mg de proteína y por min. El punto de intersección de cada recta con el eje de ordenadas representa el valor de  $1/V_{max}$  apar para esa concentración de nitrato y a concentración 'infinita' de NADH.

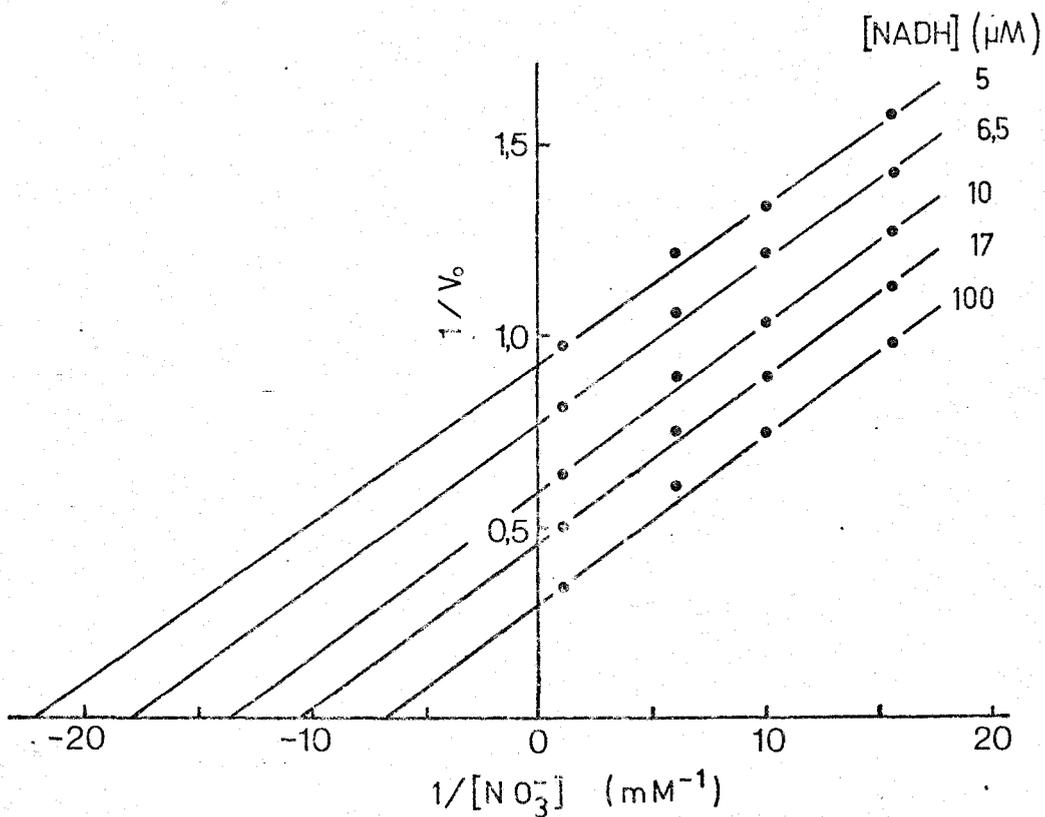


Figura 12. Representación de dobles recíprocos de la velocidad inicial de reacción de la actividad NADH-nitrato reductasa frente a la concentración de nitrato a concentraciones fijas de NADH. Las condiciones experimentales se encuentran detalladas en la Fig. anterior. El punto de intersección de cada recta con el eje de ordenadas representa el valor de  $1/V_{\text{max}}$  para esa concentración de NADH y a concentración 'infinita' de nitrato.

Tomando los valores recíprocos en ambos miembros de la ecuación (1), podemos deducir la siguiente expresión:

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_{m\text{NADH}}}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{\{\text{NADH}\}} + \frac{K_{m\text{NO}_3^-} + \{\text{NO}_3^-\}}{V_{\text{max}} \cdot \{\text{NO}_3^-\}} \quad (2)$$

Esta ecuación da cuenta de los datos cinéticos mostrados en la Fig. 11, donde la representación de  $1/v_0$  frente a  $1/\{\text{NADH}\}$  supone una línea recta cuya intersección con el eje de ordenadas sería  $1/V_{\text{max apar}}$  ( $V_{\text{max apar}} = V_{\text{max}}$  sólo limitada por la concentración de nitrato, ya que la concentración de NADH es 'infinita'), y la intersección con el eje de abscisas sería  $1/K_{m\text{NADH apar}}$  ( $K_{m\text{NADH apar}} = K_{m\text{NADH}}$  sólo limitada por la concentración de nitrato). La pendiente de dicha recta sería  $K_{m\text{NADH}}/V_{\text{max}}$ .

Si en la ecuación (2) hacemos  $1/\{\text{NADH}\}=0$ , tenemos que:

$$\frac{1}{V_{\text{max apar}}} = \frac{K_{m\text{NO}_3^-}}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{\{\text{NO}_3^-\}} + \frac{1}{V_{\text{max}}} \quad (3)$$

ecuación que explica los resultados de la Fig. 13, donde se representan los valores obtenidos en la Fig. 11 para  $1/V_{\text{max apar}}$  frente a  $1/\{\text{NO}_3^-\}$ . Dicha representación, correspondiente a una línea recta cuya pendiente es igual a  $K_{m\text{NO}_3^-}/V_{\text{max}}$ , permite calcular una  $K_m$  para el nitrato igual a 0,17 mM (Fig. 13).

Por el contrario, tomando nuevamente los valores recíprocos de ambos miembros en la ecuación (1), se puede obtener esta otra expresión:

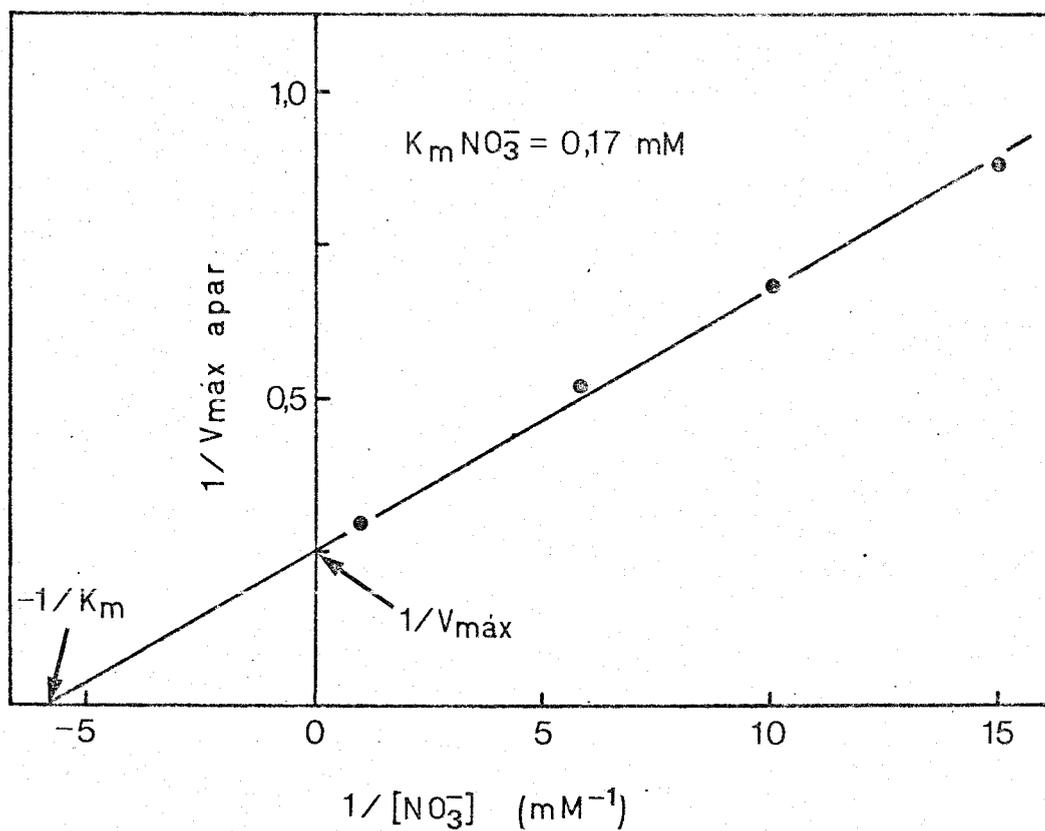


Figura 13. Representación de dobles recíprocos de la velocidad máxima aparente de reacción frente a distintas concentraciones de nitrato. Esta representación procede de la Fig. 11, donde el valor de las intersecciones de las rectas con el eje de ordenadas corresponde a  $1/V_{\text{max apar}}$ , y se usó para calcular el valor de la  $K_m$  para el nitrato. Las condiciones experimentales se detallan en la Fig. 11.

$$\frac{1}{v_o} = \frac{K_{mNO_3^-}}{V_{max}} \cdot \frac{1}{\{NO_3^-\}} + \frac{K_{mNADH} + \{NADH\}}{V_{max} \cdot \{NADH\}} \quad (4)$$

la cual es semejante a la ecuación (2), y da cuenta de los datos cinéticos de la Fig. 12. La representación gráfica obtenida corresponde a una línea recta cuya intersección con el eje de ordenadas es igual a  $1/V_{max \text{ apar}}$  ( $V_{max \text{ apar}} = V_{max}$  sólo limitada por la concentración de NADH), su intersección con el eje de abscisas es  $1/K_{mNO_3^- \text{ apar}}$  ( $K_{mNO_3^- \text{ apar}} = K_{mNO_3^-}$  sólo limitada por la concentración de NADH) y su pendiente es igual a  $K_{mNO_3^-}/V_{max}$ .

Si en la ecuación (4) hacemos  $1/\{NO_3^-\}=0$ , tenemos que:

$$\frac{1}{V_{max \text{ apar}}} = \frac{K_{mNADH}}{V_{max}} \cdot \frac{1}{\{NADH\}} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

ecuación que explica los resultados de la Fig. 14, donde se representan los valores obtenidos en la Fig. 12 para  $1/V_{max \text{ apar}}$  frente a  $1/\{NADH\}$ . Dicha representación, correspondiente a una línea recta cuya pendiente es  $K_{mNADH}/V_{max}$ , permite calcular una  $K_m$  para el NADH igual a  $12,8 \mu M$  (Fig. 14)

Por otra parte, a partir de las pendientes de las rectas que definen las ecuaciones (3) y (5), y conociendo los valores de  $K_{mNO_3^-}$  y  $K_{mNADH}$ , se puede calcular una  $V_{max}$  igual a  $4 \mu mol$  de NADH oxidado por min y por mg de proteína. Por tanto, una vez

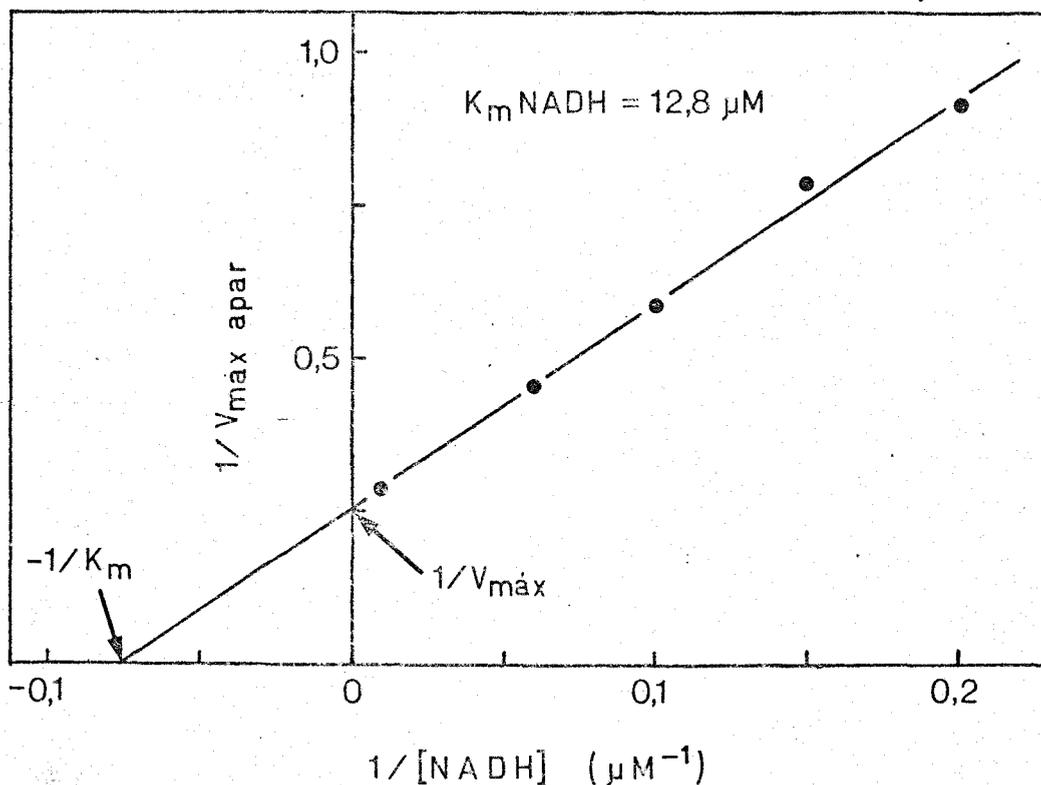


Figura 14. Representación de dobles recíprocos de la velocidad máxima aparente de reacción frente a diferentes concentraciones de NADH. Esta representación procede la Fig. 12, donde el valor de las intersecciones de las rectas con el eje de ordenadas corresponde a  $1/V_{\text{max apar}}$ , y se usó para calcular el valor de la  $K_m$  para el NADH. Las condiciones experimentales se detallan en la Fig. 11.

determinados los valores de  $K_{mNO_3^-}$ ,  $K_{mNADH}$  y  $V_{max}$ , esta última dependiente de la cantidad de enzima utilizada en cada caso, es posible calcular, de acuerdo con la ecuación (1), la velocidad inicial ( $v_0$ ) de la reacción enzimática catalizada por la nitrato reductasa de *A. braunii*, cuya cinética pertenece al tipo Ping-Pong.

### III.B.6.2. Inhibición por nitrito de la actividad catalítica.

#### Determinación de la $K_i$ frente al NADH.

Los productos de una reacción enzimática son sustratos de la reacción inversa y, por tanto, el efecto de aquéllos suele ser el de inhibir la reacción en el primer sentido indicado. Así pues, un estudio completo del tipo de inhibición que ejerce cada uno de los productos frente a cada sustrato permite hacer una evaluación mucho más exacta del mecanismo cinético de la reacción estudiada (Cleland, 1963b; 1967). En el caso concreto de la nitrato reductasa, y una vez clasificada su cinética como perteneciente al tipo Ping-Pong, es esencial estudiar la inhibición del nitrito respecto al NADH para determinar la existencia de algún tipo de isomerización en la forma final del enzima antes de comenzar un nuevo ciclo catalítico. Midiendo las velocidades iniciales de la reacción a concentraciones variables de un sustrato, manteniendo constante la concentración del otro sustrato, y en presencia de diferentes concentraciones de nitrito, se ha demostrado que el nitrito inhibe la reacción cataliza

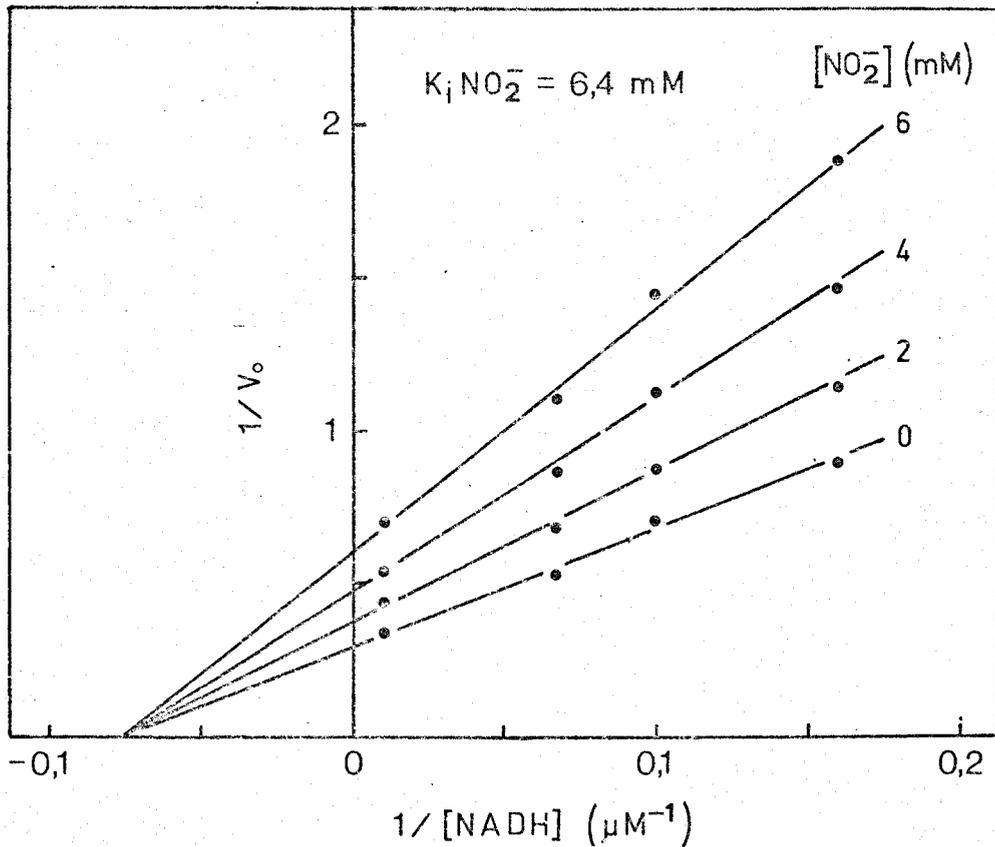


Figura 15. Inhibición por nitrito de la actividad NADH-nitrato reductasa utilizando NADH como sustrato variable. La actividad NADH-nitrato reductasa se ensayó según se describe en Materiales y Métodos, con nitrato como sustrato saturante y NADH a las concentraciones indicadas. La mezcla de ensayo contenía además nitrito sódico a la concentración que se indica.

da por la nitrato reductasa (Fig. 15). Esta inhibición es de tipo no competitivo respecto al NADH, pudiéndose calcular una  $K_i = 6,4$  mM.

### III.C. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DEL COMPLEJO ENZIMATICO NITRATO REDUCTASA Y DE SU(S) SUBUNIDAD(ES).

#### III.C.1. *Determinación del peso molecular de la nitrato reductasa.*

El peso molecular de la nitrato reductasa de *A. braunii* en su estado nativo se determinó empleando tres métodos diferentes.

##### III.C.1.1. Filtración en gel y centrifugación en gradiente de sacarosa.

El radio de Stokes de la nitrato reductasa se determinó por filtración a través de una columna de Bio-Gel A-1.5m, según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se representan en la Fig. 16, pudiéndose calcular un radio de Stokes para la nitrato reductasa de 9,8 nm.

El coeficiente de sedimentación del enzima se determinó por centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa (5-20%) como se indica en el apdo. II.D.2. Los resultados obtenidos

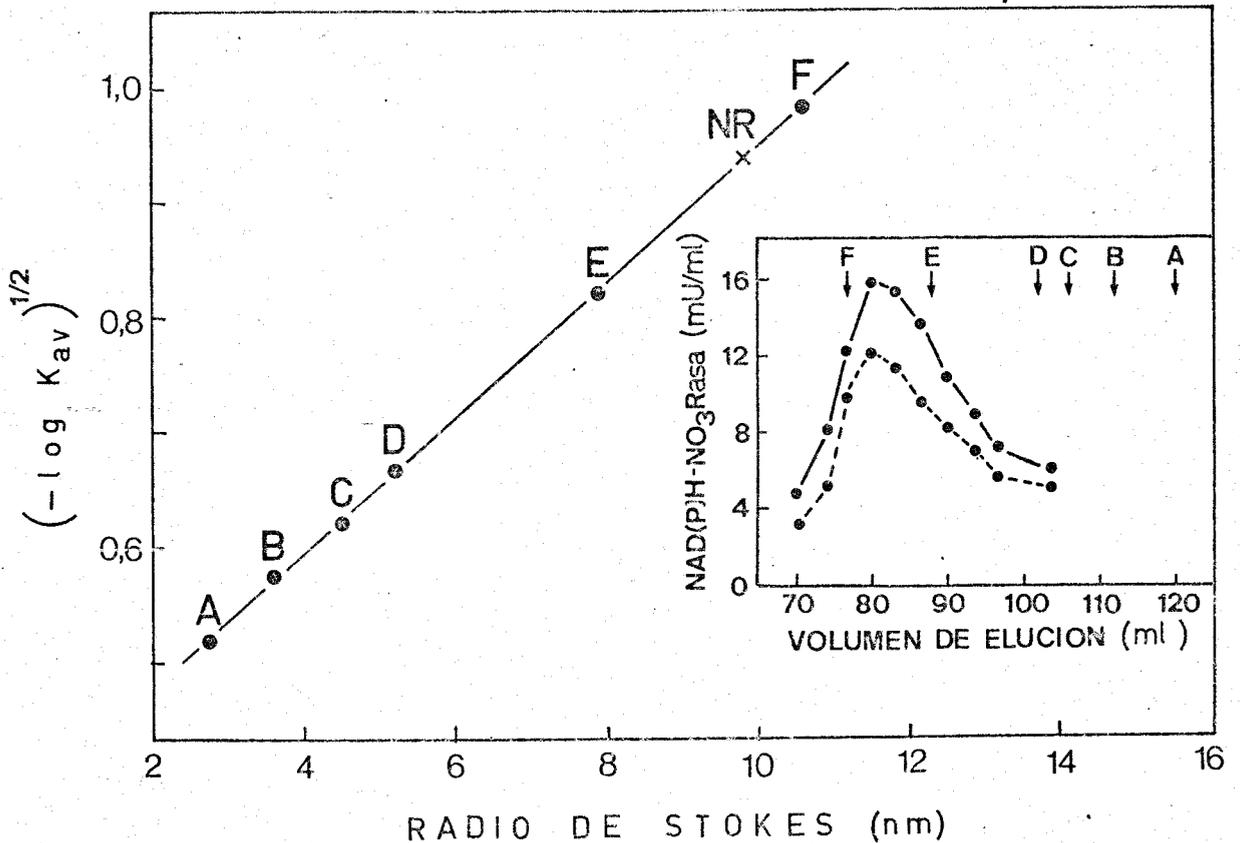


Figura 16. *Determinación del radio de Stokes de la nitro reductasa.* Las proteínas de radio de Stokes conocido usadas como patrones fueron: A, ovalbúmina, 2,75 nm; B, seroalbúmina, 3,5 nm; C, alcohol deshidrogenasa, 4,6 nm; D, catalasa, 5,2 nm; E, ferritina, 7,8 nm; y F, fibrinógeno, 10,7 nm. NR = nitrate reductase. En el recuadro interno se presenta la distribución de la actividad nitrate reductase con NADH (—) o NADPH (---) como donador de electrones, después de la filtración en una columna (2,5 x 46 cm) de Bio-Gel A 1.5 m (100-200 mesh). Las flechas indican el volumen de elución de las proteínas usadas como patrones. Otros detalles del procedimiento se describen en Materiales y Métodos.

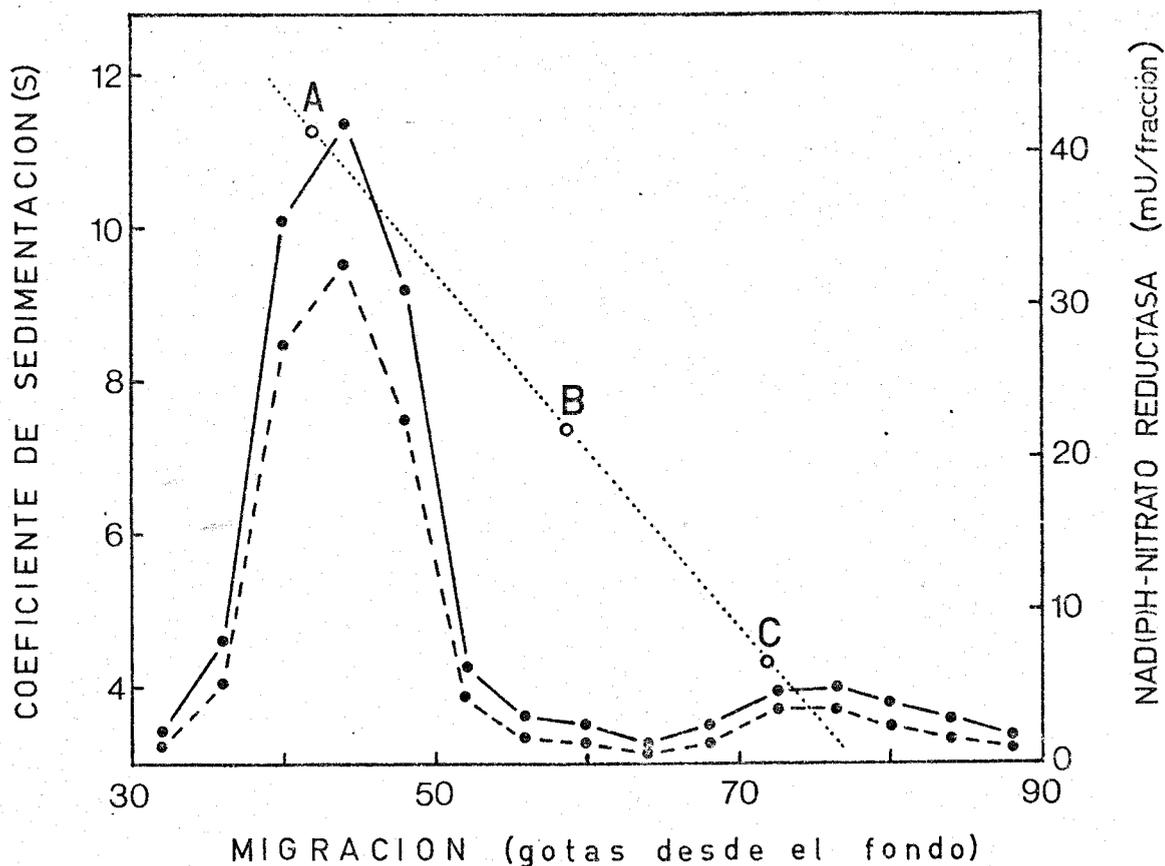


Figura 17. *Determinación del coeficiente de sedimentación de la nitrato reductasa.* Las proteínas de coeficiente de sedimentación (O) conocido usadas como patrones fueron: A, catalasa, 11,3 S; B, alcohol deshidrogenasa, 7,4 S; y C, seroalbúmina, 4,3 S. Los círculos negros representan la distribución de la actividad nitrato reductasa con NADH (—) o NADPH (---) como donador de electrones, después de la centrifugación en gradiente de sacarosa. Los detalles del procedimiento se describen en Materiales y Métodos.

después de la centrifugación, representados en la Fig. 17, permiten calcular un coeficiente de sedimentación para el complejo enzimático de 10,9 S. Por otra parte, un pico menor de actividad NAD(P)H-nitrato reductasa se observa a 3,9 S, el cual probablemente corresponde a la(s) subunidad(es) del enzima.

Teniendo en cuenta los valores calculados para el radio de Stokes,  $r_s$ , (9,8 nm) y el coeficiente de sedimentación,  $S_{20,w}$ , (10,9 S) de la nitrato reductasa, así como su volumen específico aparente,  $\bar{v}$ , (0,730 ml·g<sup>-1</sup>, apdo. III.D.1.), el peso molecular del enzima puede determinarse a partir de la ecuación (Siegel y Monty, 1965):

$$PM = 6\pi r_s \eta N S_{20,w} / (1 - \bar{v}\rho)$$

donde PM representa el peso molecular,  $\eta$  es la viscosidad del medio (asumida como 0,01002 g·s<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>) y  $\rho$ , la densidad (0,99823 g·ml<sup>-1</sup>). El peso molecular calculado por este procedimiento fue 449.000.

### III.C.1.2. Electroforesis en geles de diferente concentración de acrilamida.

El peso molecular de la nitrato reductasa también se determinó por el método descrito por Hedrick y Smith (1968), mediante electroforèsis en geles de poliacrilamida con diferente concentración de acrilamida. El alto poder de resolución de la

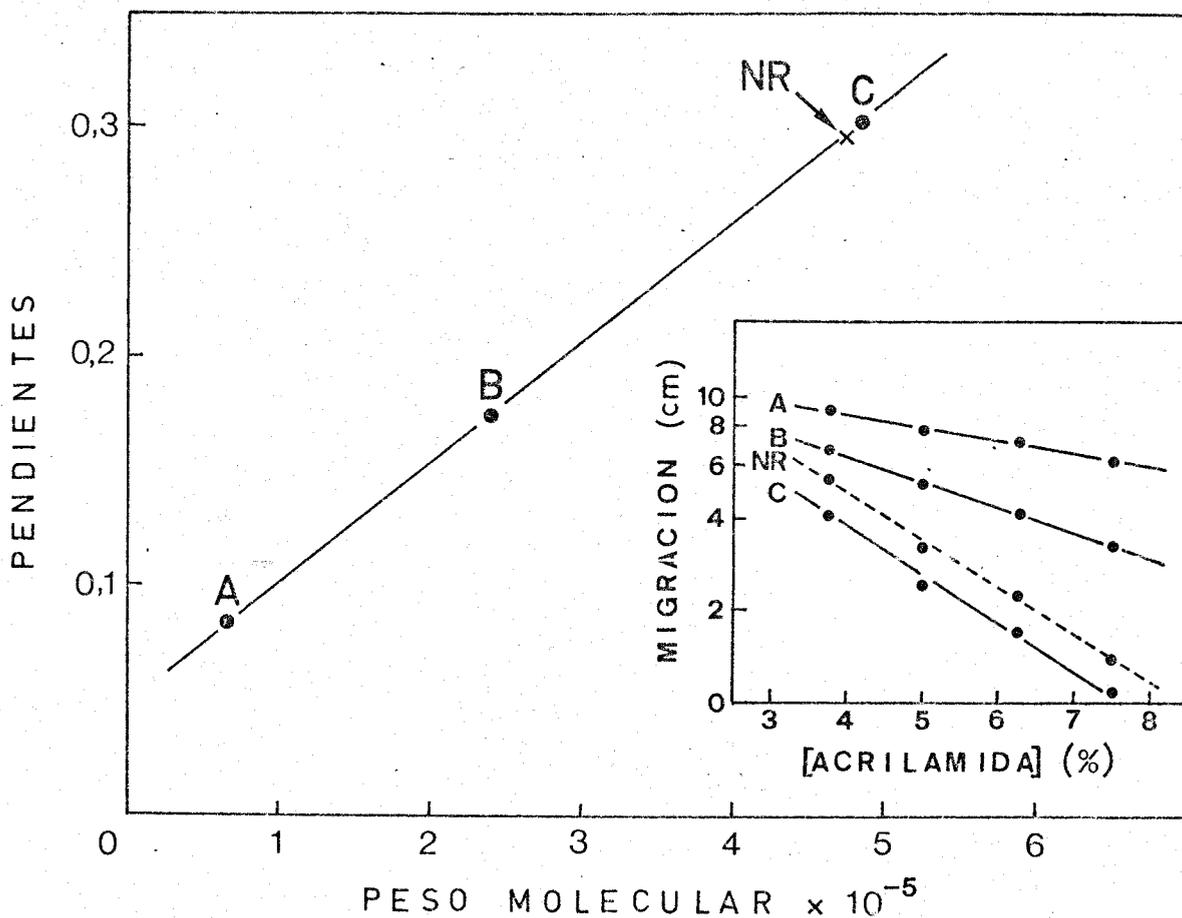


Figura 18. Determinación del peso molecular de la nitrato reductasa por electroforesis en geles de diferente concentración de acrilamida. Las proteínas de peso molecular conocido usadas como patrones fueron: A, seroalbúmina, 65.000; B, catalasa, 240.000; y C, ureasa, 483.000. NR = nitrato reductasa. En el eje de ordenadas se representan las pendientes de las rectas del recuadro interno. Los detalles del procedimiento se describen en Materiales y Métodos.

electroforesis en gel hace de ella una técnica muy eficaz para la separación y caracterización de las proteínas en base fundamentalmente a su tamaño y carga eléctrica (Sober *et al*, 1965). La representación del logaritmo de la movilidad electroforética de las proteínas frente a la concentración de acrilamida del gel da lugar a una serie de líneas no paralelas, cuyas pendientes están directamente relacionadas con el peso molecular (Hedrick y Smith, 1968), eliminándose de esta forma el efecto de la carga de las proteínas y pudiéndose estudiar por electroforesis en función únicamente de su tamaño.

Muestras de 20-50  $\mu$ l con la nitrato reductasa y/o las proteínas estándares, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con 3,75; 5,00; 6,25 y 7,50 % (p/v) de acrilamida. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 18, y permiten calcular un peso molecular para la nitrato reductasa de 473.000.

### III.C.1.3. Electroforesis en gradiente de concentración de acrilamida.

La electroforesis en placas de poliacrilamida con un gradiente de acrilamida desde el 4 hasta el 30% (p/v), lo que equivale a un gradiente en el tamaño de poro del gel, se usó como un tercer método para determinar el peso molecular de la nitrato reductasa. Las proteínas se mueven en el gradiente has-

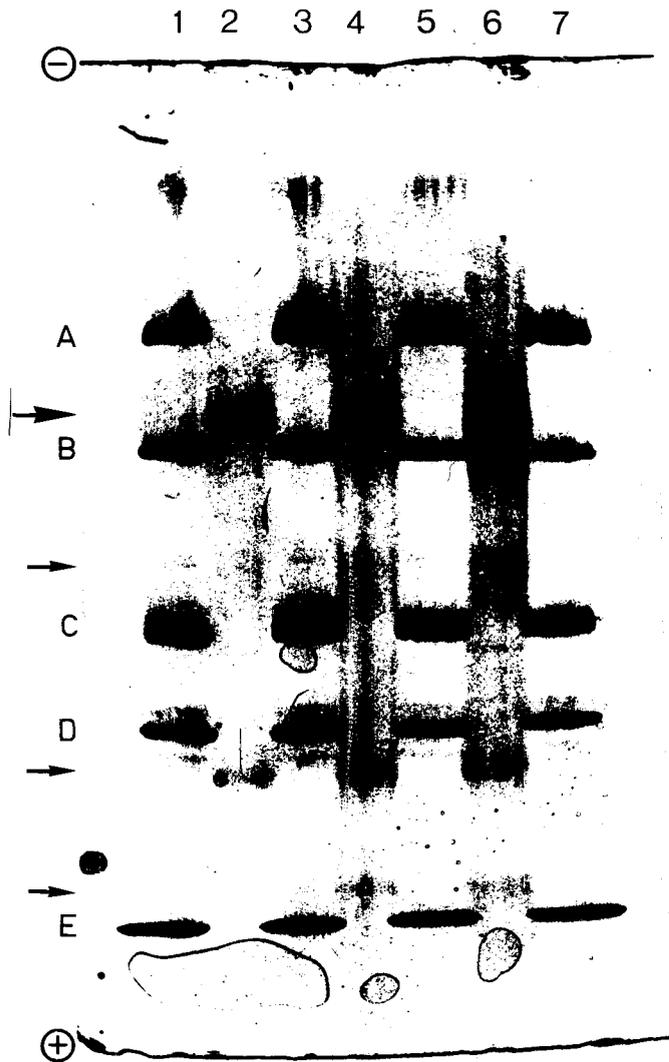


Figura 19. *Determinación del peso molecular de la nitrato reductasa por electroforesis en un gradiente de concentración de acrilamida.* El proceso electroforético se desarrolló en una placa de poliacrilamida, cuya concentración variaba linealmente desde el 4 hasta el 30%. Las proteínas usadas como patrones fueron: A, tiroglobulina, 669.000; B, ferritina, 440.000; C, catalasa, 232.000; D, lactato deshidrogenasa, 140.000; y E, seroalbúmina, 67.000. En las calles n° 1, 3, 5 y 7 se aplicaron 5  $\mu$ g de cada una de las proteínas estándares, mientras que en las calles n° 2, 4 y 6 se aplicaron 5, 10 y 15  $\mu$ g de nitrato reductasa, respectivamente. La flecha mayor ( $\rightarrow$ ) localiza la posición del complejo nitrato reductasa, mientras que las otras flechas ( $\rightarrow$ ) localizan las otras bandas de menor peso molecular.

ta llegar a un punto en que el tamaño del poro se hace limitante y le impide seguir avanzando (Margolis y Wrigley, 1975).

Las muestras conteniendo la nitrato reductasa o las proteínas estándares se aplicaron en distintas calles de la placa de poliacrilamida, y se llevó a cabo la electroforesis según se describe en Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos se observan en la fotografía mostrada en la Fig. 19, donde la banda mayor de nitrato reductasa —probablemente el complejo enzimático— corresponde a un peso molecular de 480.000, mientras que las bandas menores corresponden a proteínas cuyos pesos moleculares son submúltiplos de 480.000, *i.e.* 245.000, 123.600, etc. Es difícil saber si estas bandas menores son impurezas o artefactos electroforéticos, pero probablemente puedan deberse a diferentes estados de agregación de las subunidades del enzima.

### III.C.2. *Determinación del peso molecular de la(s) subunidad(es) de la nitrato reductasa. Electroforesis en SDS.*

Preparaciones homogéneas de nitrato reductasa de *A. braunii* se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, como se describe en el apdo. II.D.4.4. La presencia de una sola banda de proteína en los geles confirman la homogeneidad de la preparación enzimática, a la vez que pone de manifiesto la contribución a la estructura del enzima de una única cadena polipeptídica, o bien de varias del mismo

tamaño y, por consiguiente, de la misma movilidad electroforética. El gel teñido para proteína, así como su densitograma, se muestra en la Fig. 20

A fin de calcular el peso molecular de la(s) subunida(es) de la nitrato reductasa, se sometieron simultáneamente a electroforesis en las mismas condiciones el enzima y varias proteínas marcadoras con cadenas polipeptídicas de peso molecular conocido. En el recuadro interno de la Fig. 20 se muestra el resultado obtenido al representar la movilidad electroforética de las distintas proteínas relativa al  $\alpha$ -quimotripsinógeno. Un peso molecular de 58.000 se calculó para la(s) subunidad(es) de la nitrato reductasa de *A. braunii*.

En vista de que estos datos eran bastante diferentes a los hasta ahora descritos para otras nitrato reductasas, según se pone de manifiesto posteriormente en la Discusión, se reexaminó el peso molecular de la(s) subunidad(es) del enzima de *A. braunii*, calentando las muestras a 100°C durante 10 min y usando como referencia un conjunto de proteínas estándares de PHARMACIA (Suecia) conteniendo: fosforilasa *b*, seroalbúmina; ovalbúmina; anhidrasa carbónica; inhibidor de la tripsina de soja y  $\alpha$ -lactalbúmina. Los resultados obtenidos (no mostrados) permiten calcular un peso molecular de 59.500 para la(s) subunidad(es) de la nitrato reductasa de *A. braunii*.

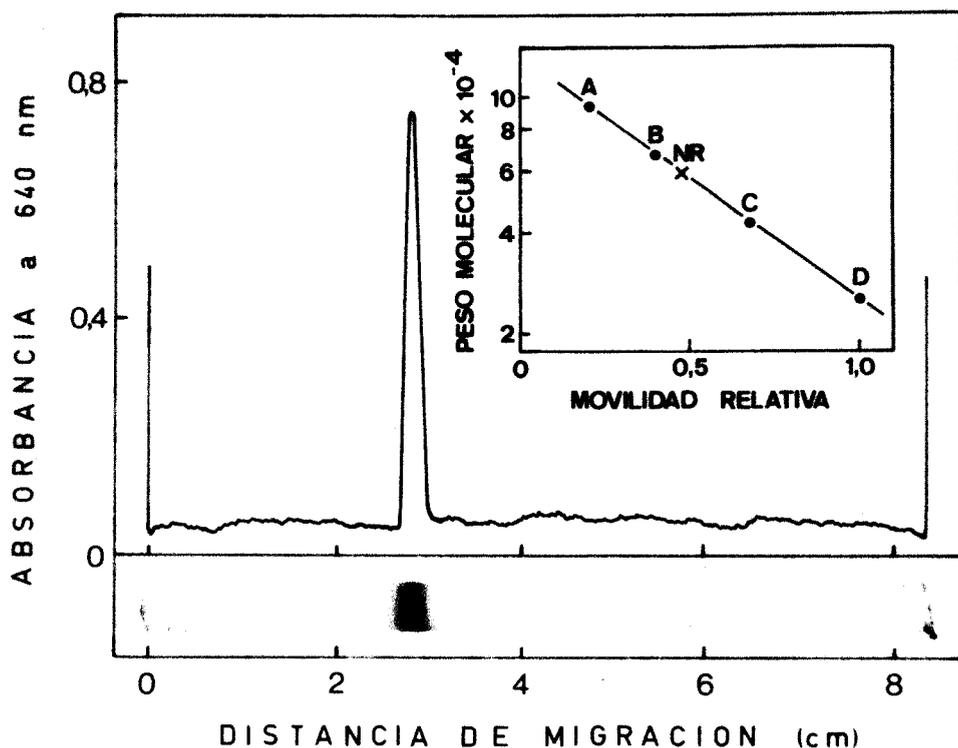


Figura 20. Determinación del peso molecular de la(s) sub-unidad(es) de la nitrato reductasa por electroforesis en presencia de dodecil-sulfato sódico. Las cadenas polipeptídicas de peso molecular conocido usadas como patrones fueron: A, fosforilasa  $\alpha$ , 94.000; B, seroalbúmina, 67.000; C, ovalbúmina, 43.000; y D,  $\alpha$ -quimotripsinógeno, 25.700. NR = nitrato reductasa. Muestras de 20  $\mu\text{g}$  de nitrato reductasa y 5-10  $\mu\text{g}$  de cada proteína estándar se sometieron a electroforesis en presencia de SDS, según se describe en Materiales y Métodos. En la Fig. se presenta el gel correspondiente a la nitrato reductasa, así como su densitograma. En el recuadro interno, la movilidad de cada cadena polipeptídica se refiere a la del  $\alpha$ -quimotripsinógeno.

### III.C.3. *Estimación del número de subunidades que componen el complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa.*

Teniendo en cuenta los valores obtenidos para el peso molecular del complejo enzimático nitrato reductasa de *A. braunii* según los tres métodos empleados, el valor medio de 467.400 (Tabla V) se considera como el peso molecular del enzima en su estado nativo y en base al cual se han hecho todos los cálculos moleculares presentados en este trabajo.

Por otra parte, el peso molecular de la(s) subunidad(es) del enzima se considera como 58.750 (Tabla V), valor medio obtenido de las dos determinaciones realizadas por electroforesis en SDS.

Estos datos, 467.400 para el complejo enzimático y 58.750 para su(s) subunidad(es), indican claramente que la nitrato reductasa de *A. braunii* está compuesta por ocho subunidades de igual tamaño.

### III.D. ANALISIS DE LA COMPOSICION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. braunii*.

TABLA V

PESO MOLECULAR DEL COMPLEJO ENZIMATICO NITRATO REDUCTASA DE *A. braunii* Y DE SU(S) SUBUNIDAD(ES).

Método de determinación	Peso molecular	
	Complejo enzimático	Subunidad(es)
1. Filtración en gel y <u>cen</u> trifugación en gradiente de densidad	449.000	-
2. Electroforesis en geles de diferente concentración de acrilamida	473.000	-
3. Electroforesis en gradiente de acrilamida	480.000	-
4. Electroforesis en SDS <sup>a</sup>	-	59.500
5. Electroforesis en SDS <sup>b</sup>	-	58.000
Media	467.400	58.750

a) Las proteínas patrones fueron: fosforilasa *b*, 94.000; seroalbúmina, 67.000; ovalbúmina, 43.000; anhidrasa carbónica, 30.000; inhibidor de la tripsina de soja, 20.100; y  $\alpha$ -lactalbúmina, 14.400.

b) Las proteínas usadas como patrones se citan en la Fig. 20

### III.D.1. *Análisis de aminoácidos*

Los resultados del análisis de aminoácidos de la nitrato reductasa de *A. braunii* se presentan en la Tabla VI, donde se puede observar el alto exceso de aminoácidos ácidos respecto a los básicos, así como la ausencia de triptofano. En comparación con la nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* (Giri y Ramadoss, 1979), es importante destacar: 1) el contenido en aminoácidos aromáticos es 7,70% (mol/mol) en *A. braunii* y 5,24% en *C. vulgaris*; 2) el contenido en metionina es 0,25% en *A. braunii* y 1,93% en *C. vulgaris*; y 3) el exceso de residuos ácidos respecto a los básicos es 8,18% en *C. vulgaris* y 5,22% en *A. braunii*.

El volumen específico aparente de la nitrato reductasa se calculó a partir de su composición de aminoácidos (Schachman, 1957), según se describe en la Tabla VII. Un valor de 0,730 ml·g<sup>-1</sup> se estimó para el enzima de *A. braunii*, el cual se empleó para determinar su peso molecular (apdo. III.C.1.).

### III.D.2. *Espectros de absorción del enzima oxidado y reducido*

La nitrato reductasa exhibe el espectro de absorción mostrado en la Fig. 21 (Curvas A y B) con máximos de absorbancia a 278 y 414 (Soret) nm, y hombros a 455, 484, 532, 562 y 669 nm. Usando concentraciones superiores de enzima, los últi-

TABLA VI

COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. braunii*

Aminoácido	Residuos por subunidad	Concentración molar (%)
Lisina	28	5,18
Histina	14	2,55
Arginina	32	5,92
Acido aspártico	54	9,86
Treonina <sup>a</sup>	33	6,13
Serina <sup>a</sup>	34	6,31
Acido glutámico	49	9,01
Prolina	34	6,24
Glicina	48-49	8,94
Alanina	54	9,96
Cistina (1/2) <sup>b</sup>	11	2,06
Valina	40	7,30
Metionina	1-2	0,25
Isoleucina	26	4,72
Leucina	43	7,87
Tirosina	20	3,62
Fenilalanina	22	4,08
Triptófano <sup>c</sup>	<1	—

a) Estimado por extrapolación a tiempo cero de hidrólisis

b) Medido como ácido cistéico después de la oxidación con ácido per fórmico.

c) Determinado por el método de Matsubara y Sasaki (1969).

Los detalles del procedimiento se encuentran en Materiales y Métodos. Excepto donde se indica, cada valor es la media de los resultados obtenidos después de 24 y 72 h de hidrólisis.

TABLA VII

DETERMINACION DEL VOLUMEN ESPECIFICO APARENTE DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. braunii*

Aminoácido	Residuos por molécula	$W_i^a$ (%)	$V_i^b$ (ml·g <sup>-1</sup> )	$V_i \cdot W_i$ (%)
Lisina	223,76	6,138	0,82	5,03
Histidina	110,35	3,238	0,67	2,17
Arginina	255,95	8,543	0,70	5,98
Acido aspártico	426,07	10,492	0,59	6,19
Treonina	265,14	5,736	0,70	4,02
Serina	272,81	5,083	0,63	3,20
Acido glutámico	389,29	10,755	0,66	7,10
Prolina	269,74	5,606	0,76	4,26
Glicina	386,22	4,716	0,64	3,02
Alanina	430,67	6,550	0,74	4,85
Cistina (1/2)	88,89	1,962	0,63	1,24
Valina	315,72	6,697	0,86	5,76
Metionina	10,73	0,301	0,75	0,23
Isoleucina	203,84	4,936	0,90	4,44
Leucina	340,24	8,238	0,90	7,41
Tirosina	156,33	5,458	0,71	3,88
Fenilalanina	176,25	5,550	0,77	4,27
Total	4322,00	$\Sigma W_i = 100,000$		$\Sigma W_i \cdot V_i = 73,04$

$$V_p^c = \Sigma W_i \cdot V_i / \Sigma W_i = 0,7304 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$$

a)  $W_i$  representa el porcentaje (p/p) de cada aminoácido en la molécula de nitrato reductasa.

b)  $V_i$  representa el volumen específico de cada aminoácido.

c)  $V_p$  representa el volumen específico aparente de la nitrato reductasa.

mos hombros aparecen como nuevos picos a 532 ( $\beta$ ), 562 ( $\alpha$ ) y 669 nm (Fig. 21, Curva C). La relación de absorbancias  $A_{278}/A_{414}$  fué de 2,56.

La reducción del enzima con ditionito sódico o con piridín nucleótidos reducidos, da lugar a un desplazamiento, acompañado por un aumento de la extinción, de las bandas Sorret a 424 nm,  $\beta$  a 528 nm y  $\alpha$  a 557 nm (Fig. 22). Únicamente una ligera disminución de la absorbancia se observa a 669 nm al reducir el enzima (Fig. 22).

Los coeficientes de extinción milimolar de los diferentes máximos de absorbancia de la nitrato reductasa de *A. braunii* en sus estados oxidado y reducido, se presentan en la Tabla VIII.

El espectro del derivado hemocromógeno de la nitrato reductasa de *A. braunii* en piridina/KOH es idéntico al de la ferroprotoporfirina IX (Fig. 23), con máximos de absorbancia a 419, 523 y 555 nm. En base a estos resultados, el citocromo asociado a la nitrato reductasa de *A. braunii* se clasificó como de tipo *b*.

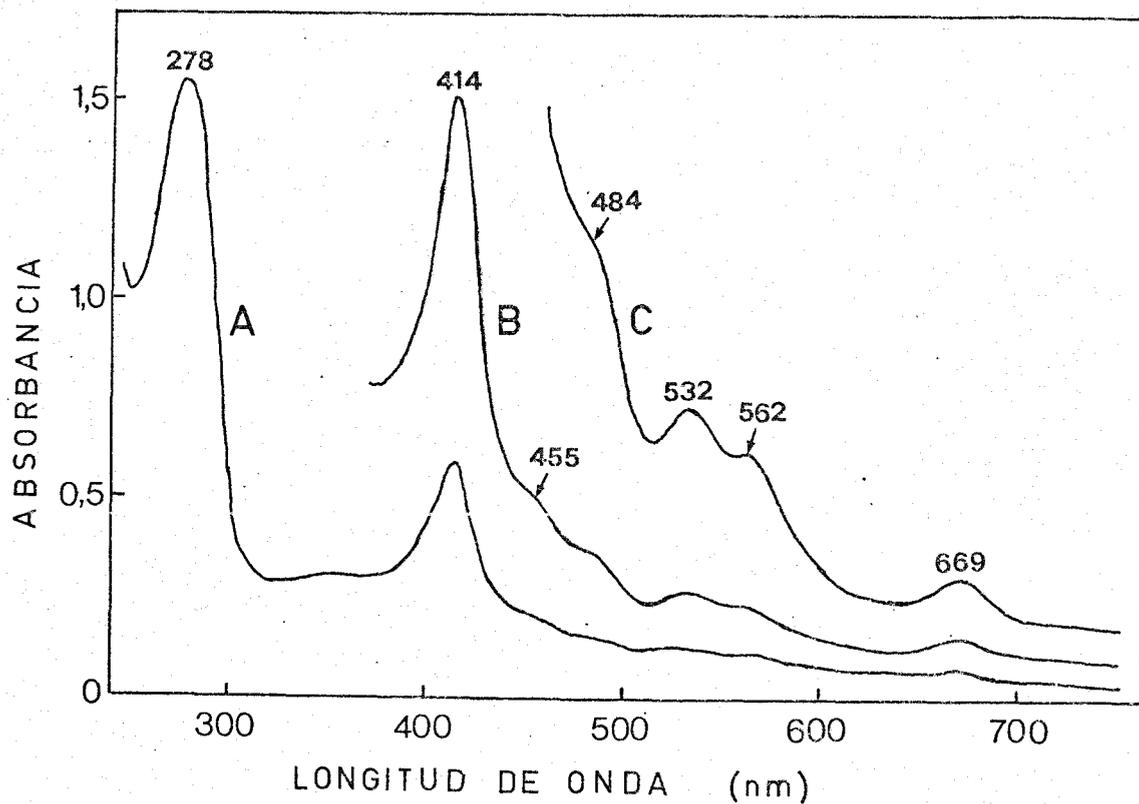


Figura 21. Espectro de absorción de la nitrato reductasa de *A. braunii*. Espectro del enzima nativo (Curva A, 1,3 μM; B, 3,2 μM; y C, 9,7 μM) en tampón de fosfato potásico 50 mM, pH 7,0.

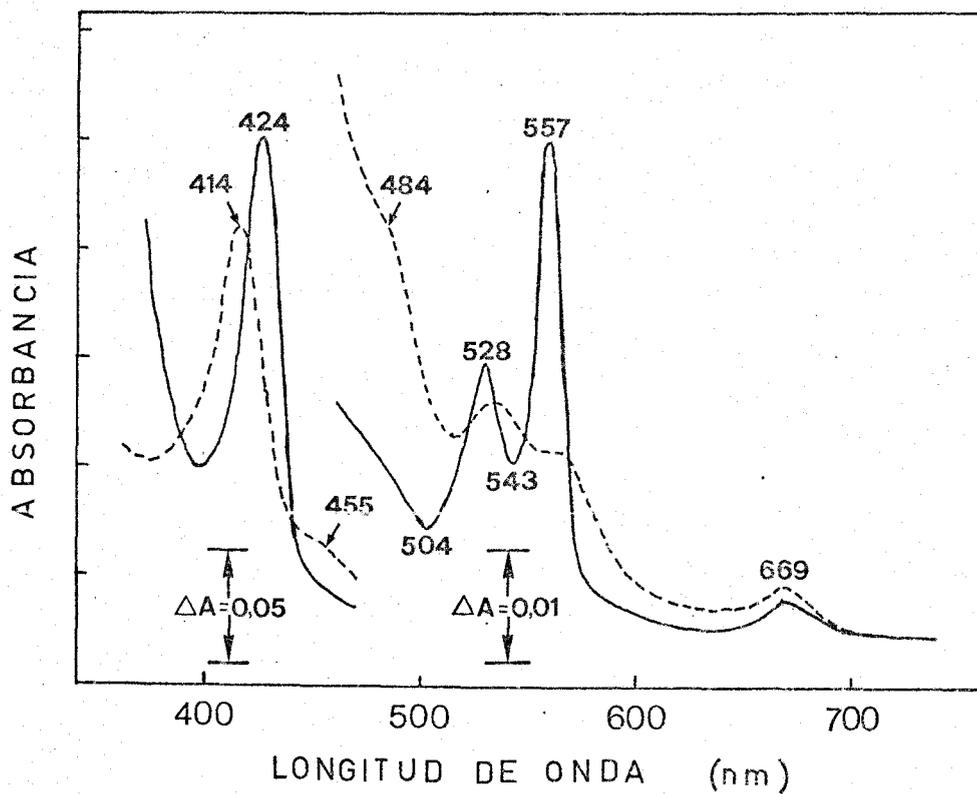


Figura 22. Espectros de absorción de la nitrato reductasa en presencia o ausencia de ditionito. La línea discontinua muestra el espectro de absorción del enzima nativo ( $0,39 \mu\text{M}$ ) en tampón fosfato  $50 \text{ mM}$  ( $\text{pH } 7,0$ ). Después de la adición de unos cristallitos de ditionito sódico, se registró el espectro de absorción (línea continua) tan pronto como fue posible.

TABLA VIII

COEFICIENTES DE EXTINCION DE LA NITRATO REDUCTASA

Longitud de onda (nm)	Estado redox del enzima	$\epsilon$ ( $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
278	oxidado	1.175
414	oxidado	460
424	reducido	620
528	reducido	84
532	oxidado	65
557	reducido	118
557-540	reducido	64

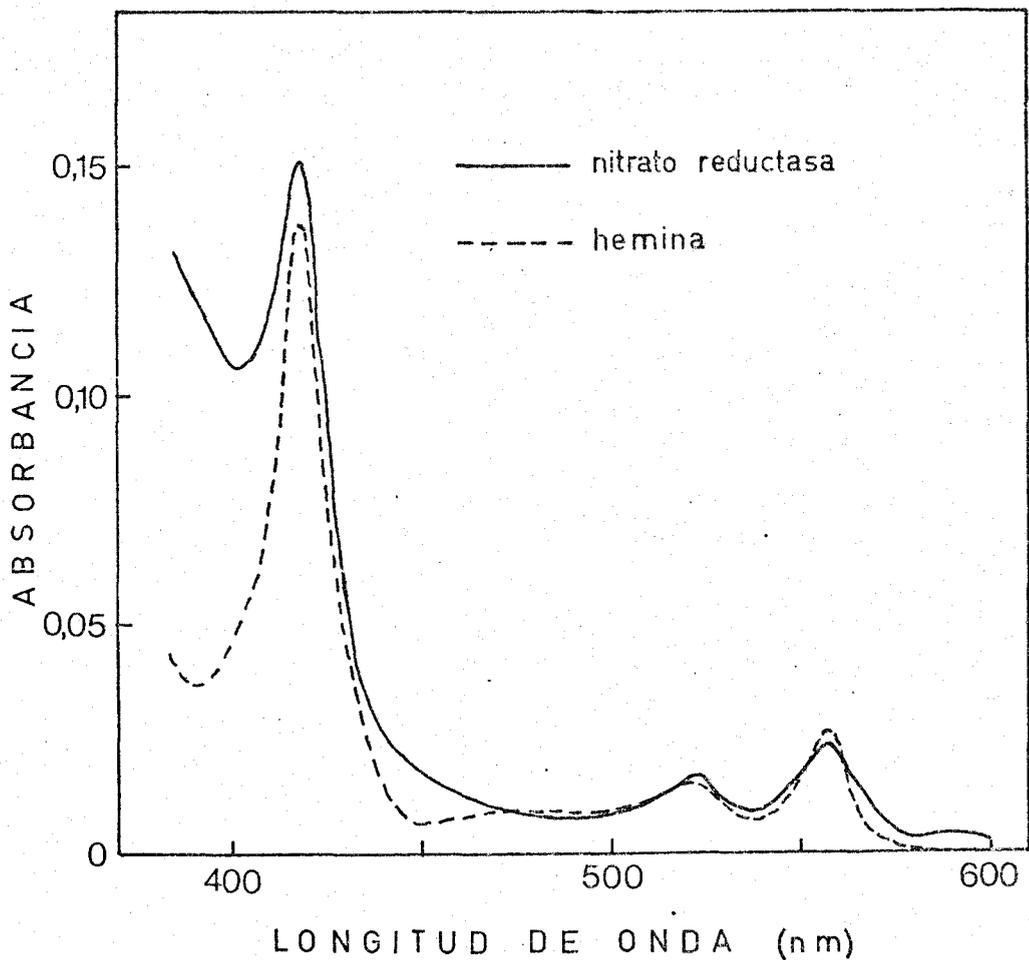


Figura 23. Espectro de absorción del grupo hemínico de la *nitrato reductasa* en piridina/KOH. A 0,5 ml de una solución con teniendo 0,08 mg de enzima, se le añadió 0,2 ml de piridina, 0,3 ml de KOH 0,2 N y unos cristallitos de ditionito sódico. El espectro de absorción del derivado hemocromógeno así obtenido se registró frente a un blanco sin enzima. La línea discontinua representa el espectro de absorción de una solución 0,9  $\mu$ M de cloruro de hemina preparada en idénticas condiciones.

La adición de nitrato (aceptor fisiológico de electrones del enzima) a la nitrato reductasa reducida por NAD(P)H (sus donadores fisiológicos de electrones) restaura rápidamente las propiedades espectrales del enzima oxidado, poniendo de manifiesto la funcionalidad del grupo hemo en la catálisis del enzima. Por el contrario, el nitrato no puede reoxidar la nitrato reductasa cuando ésta es reducida con ditionito, el cual por sí solo es incapaz de actuar como eficiente donador de electrones durante la catálisis enzimática (resultados no mostrados).

Por otra parte, las flavinas reducidas químicamente con ditionito pueden actuar como donadores de electrones para la reducción catalítica de nitrato a nitrito (Losada y Guerrero, 1979), según se puede comprobar en el apdo. III.B.3. para el caso concreto de la nitrato reductasa de *A. braunii*. Además, las flavinas excitadas por la luz pueden ser reducidas por EDTA y actuar como poderosos donadores de electrones de la nitrato reductasa de *Azotobacter chroococcum* (Llobell *et al*, 1980), *Anacystis nidulans* (Candau *et al*, 1980), otros microorganismos y plantas superiores (Zumft *et al*, 1980). En *A. braunii* el FMN fotorreducido con EDTA es un eficiente donador de electrones para la nitrato reductasa (resultados no mostrados) y capaz de reducir el citocromo  $b_{557}$  del enzima, el cual es posteriormente reoxidado por nitrato (Fig. 24).

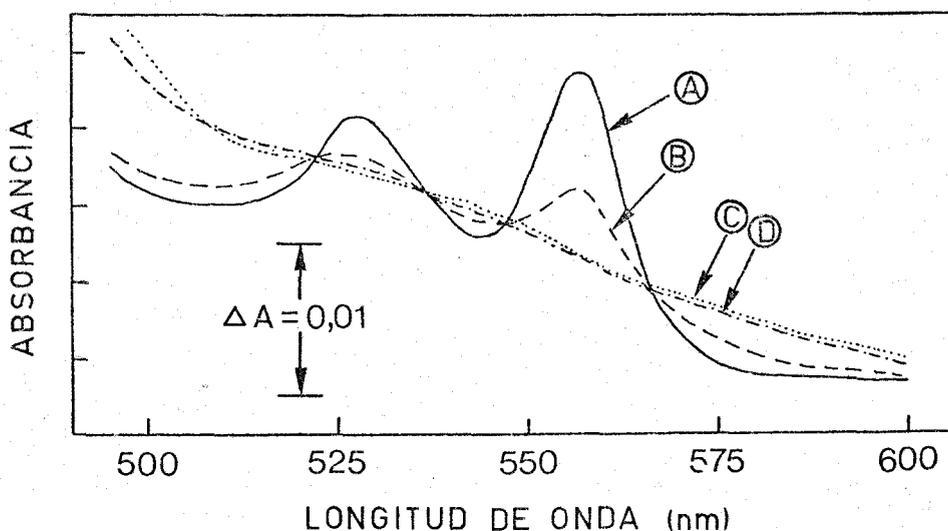
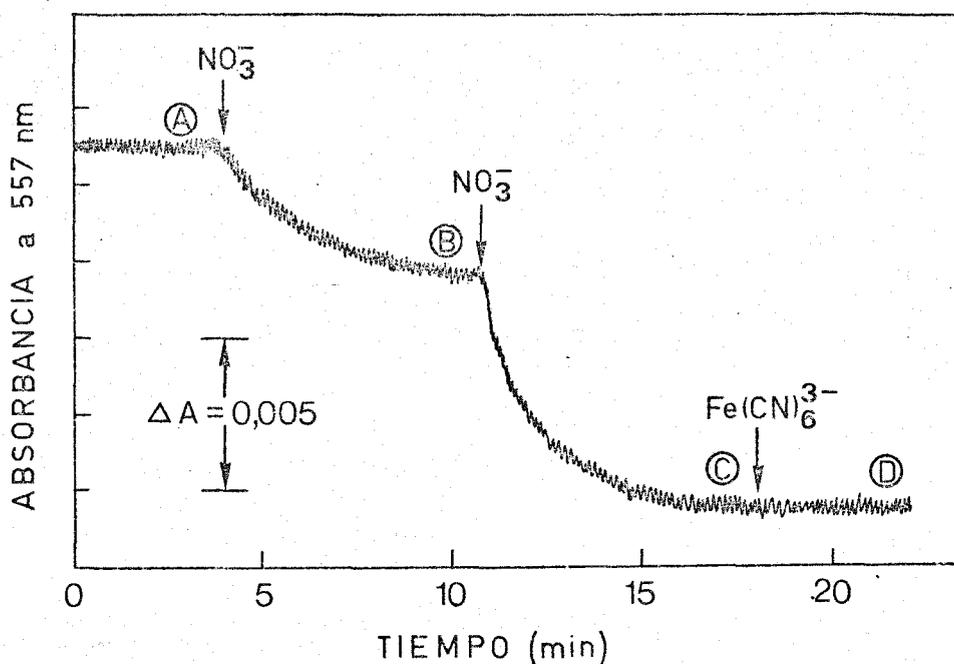


Figura 24. Reoxidación por nitrato del citocromo  $b_{557}$  de la nitrato reductasa previamente fotorreducida por flavina y EDTA. Una cubeta de espectrofotómetro contenía en un volumen final de 1 ml: 0,09 mg de nitrato reductasa, FMN  $40 \mu\text{M}$  y EDTA 10 mM en tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0). La cubeta se iluminó con luz blanca de  $100 \text{ W/m}^2$  hasta conseguir la decoloración total de la flavina, y se registró el espectro de absorción A. A continuación se hicieron dos adiciones sucesivas de nitrato potásico sólido, y se observó la disminución de la absorbancia a 557 nm, registrándose el espectro de absorción (B y C) de la preparación enzimática al estabilizarse su  $A_{557}$  después de cada adición. Finalmente, se añadieron unos cristallitos de ferricianuro potásico y se registró el espectro D. En todo momento se usó un blanco sin enzima tratado en idénticas condiciones.

En conclusión, el grupo cromóforo hemo de la nitrato reductasa de *A. braunii* es reducible por NAD(P)H o FMNH<sub>2</sub> y reoxidable por nitrato, datos que apoyan un papel activo del citocromo en el transporte de electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato.

### III.D.3. Espectros de absorción de la nitrato reductasa nativa y del deflavoenzima

Hemos visto que los espectros de absorción de la nitrato reductasa de *A. braunii* que se presentan en las Figs. 21 y 22 ponen claramente de manifiesto la presencia de citocromo en las preparaciones enzimáticas utilizadas. No obstante, es difícil deducir de ellas la presencia de flavina, a pesar de que los hombros a 455 y 484 nm podrían indicarlo, pero hay que tener en cuenta que los citocromos también absorben a estas longitudes de onda (Kajihara y Hagihara, 1968; Flatmark y Robinson, 1968).

Por otra parte, considerando que la flavina no se encuentra unida covalentemente al enzima y, por consiguiente, se disociaría fácilmente, resulta aventurado deducir la existencia de flavina en la nitrato reductasa de *A. braunii* solamente a partir de sus propiedades espectrales observadas en las Figs. 21 y 22.

Por tanto, para poner de manifiesto la presencia de flavina en la nitrato reductasa de *A. braunii*, la preparación enzimática se dializó en primer lugar durante 24 h frente a 5 l de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH7,0) conteniendo FAD 20  $\mu$ M, con objeto de provocar la entrada de FAD en el enzima y saturar todos los sitios de unión del FAD. Posteriormente, la preparación se filtró a través de una columna (1 x 13 cm) de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo tampón sin FAD, para retirar la flavina libre pero no la flavina asociada al enzima. La ausencia de fluorescencia inmediatamente después de la filtración en Sephadex G-25 indicó la remoción de toda la flavina libre (apdo. III.D.4.). El espectro de absorción de la solución enzimática así obtenida se presenta en la Fig. 25. A continuación, la preparación se volvió a dializar durante 24 h frente a 5 l del mismo tampón sin FAD, y se registró de nuevo el espectro de absorción (Fig. 25). El espectro diferencial obtenido al restar al primer espectro el segundo se muestra en la parte superior de la Fig. 25, pudiéndose comprobar que corresponde claramente al espectro de un compuesto flavínico con máximos de absorbancia a 266, 374 y 448 nm, así como un hombro a 480 nm. Se puede, por tanto, afirmar con seguridad que la nitrato reductasa de *A. braunii* posee flavina como grupo prostético y que se pierde fácilmente por diálisis prolongada en tampón sin FAD.

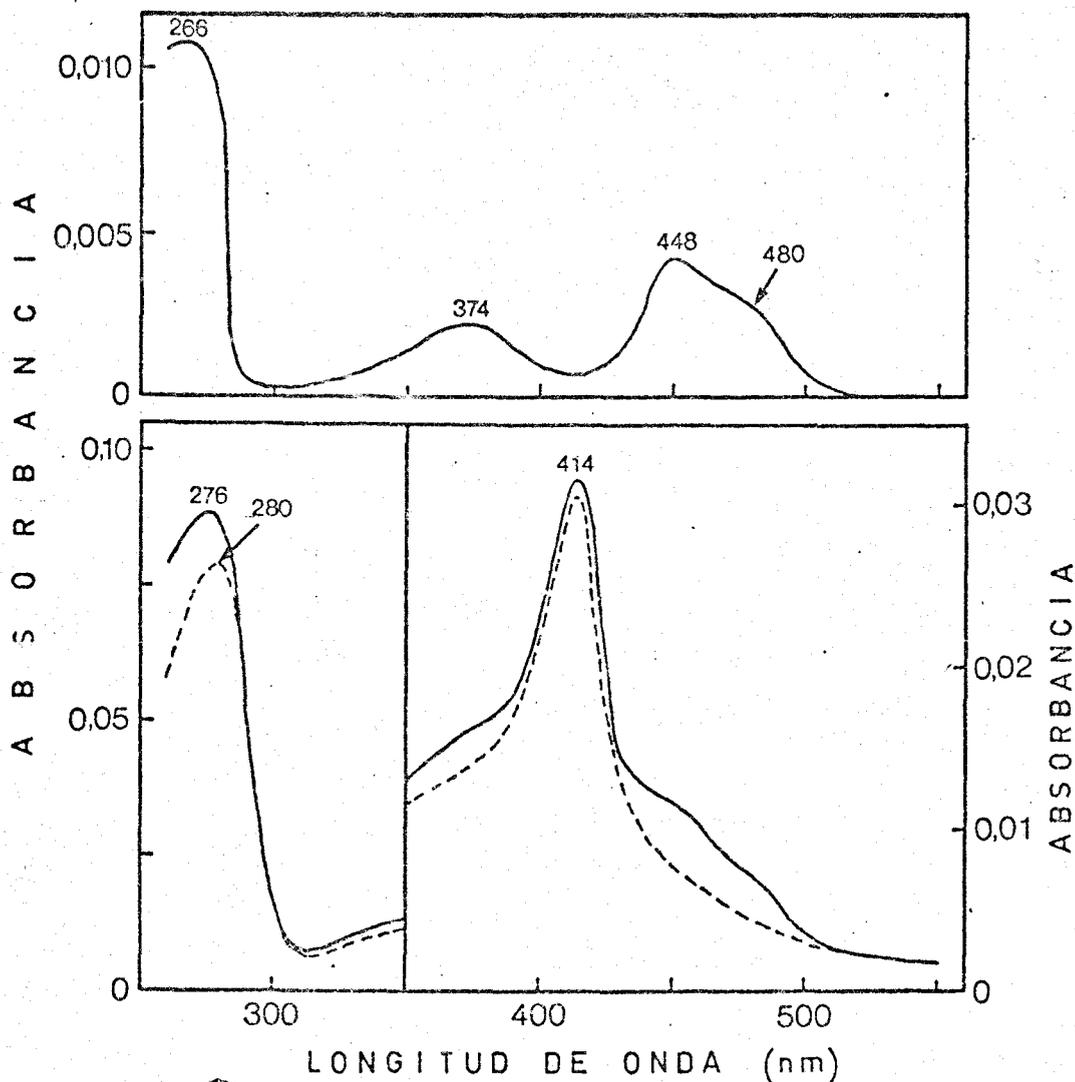


Figura 25. Espectros de absorción de la nitrato reductasa nativa (con FAD) o después de una prolongada diálisis (sin FAD). En la gráfica inferior se presentan los espectros de absorción en tampón fosfato 0,1 M (pH7,0) de la nitrato reductasa original (—) o desprovista de FAD (---). Los detalles para la obtención de ambas preparaciones enzimáticas se describen en el texto. En la gráfica superior se presenta el espectro diferencial obtenido al restarle al primer espectro el segundo.

III.D.4. *Espectros de emisión de fluorescencia de la nitrato reductasa. Participación de la flavina en la actividad catalítica.*

Si bien la fluorescencia de las flavinas unidas a las proteínas es relativamente rara, existen excepciones como la lipoil deshidrogenasa (Palmer y Massey, 1968) y la flavoproteína-ETF (*electron transferring flavoprotein*) que acopla la oxidación del NADH a la reducción de la butiril coenzima A deshidrogenasa- de *Peptostreptococcus elsdenii* (Withfield y Mayhew, 1974) que presentan fluorescencia. Se ha estudiado el comportamiento de la flavina de la nitrato reductasa de *A. braunii* en base a sus propiedades espectrofotofluorimétricas, para lo cual se tomó una solución de nitrato reductasa libre de flavina exógena, preparada según se describe en el apdo III.D.3., y se registró su espectro de emisión de fluorescencia excitando a 450 nm (Fig. 26). A pesar de que la fluorescencia inicial es prácticamente nula, la incubación de la solución a temperatura ambiente da lugar a un aumento continuo de la fluorescencia, con un máximo de emisión a 535 nm indicativo de flavina libre, acompañado por una disminución paralela de la actividad NADH-nitrato reductasa (Fig. 26, recuadro interno). Estos resultados indican que la flavina, en un principio unida a la proteína y no fluorescente, se disocia paulatinamente de la nitrato reductasa dando lugar al enzima libre de flavina (deflavoenzima) no funcional.

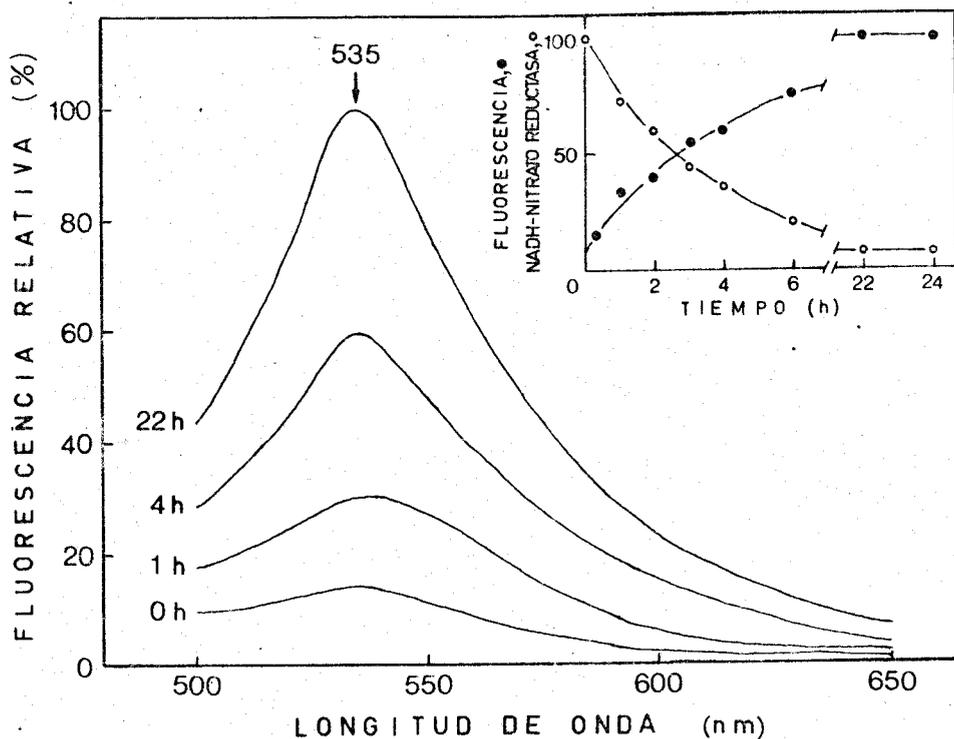


Figura 26. Espectros de emisión de fluorescencia de una preparación de nitrato reductasa incubada a temperatura ambiente. 0,5 ml de una preparación de nitrato reductasa purificada se dializó rápidamente en una columna (1 x 13 cm) de Sephadex G-25 previamente equilibrada con tampón fosfato 50 mM (pH 7,0). La solución enzimática así dializada, conteniendo 0,06 mg de nitrato reductasa, se llevó hasta un volumen final de 2,5 ml aproximadamente y se incubó durante 24 h a temperatura ambiente. Los espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc}=450$  nm) se registraron a los tiempos indicados. En el recuadro interno se representan los cambios en la emisión de fluorescencia a 535 nm ( $\lambda_{exc}=450$  nm) y de actividad NADH-nitrato reductasa en función del tiempo de incubación.

III.D.5. *Espectros de resonancia paramagnética del electrón (EPR) de la nitrato reductasa oxidada y reducida*

El espectro de EPR de la nitrato reductasa de *A. braunii* (Fig. 27) muestra amplias señales a valores de  $g$  de 2,26; 2,79 y 3,08, correspondientes a hierro hemínico de bajo *spin* (Jacob y Orme-Johnson, 1980), así como algunas señales más débiles en la región cercana a  $g = 2$ , que podrían corresponder a una pequeña proporción de molibdeno en el estado de valencia V (paramagnético) respecto al mayor contenido del enzima en MoVI (diamagnético) (Solomonson, 1979; Jacob y Orme-Johnson, 1980). La adición de ditionito sódico al enzima da lugar a la desaparición de las señales de 2,79 y 3,08  $g$ , mientras que no se observa la aparición de ninguna nueva señal (Fig. 27), probablemente debido a que todo el molibdeno se encuentra en el estado de valencia IV, más reducido y diamagnético (Jacob y Orme-Johnson, 1980; Hewitt y Notton, 1980).

III.D.6. *Análisis cuantitativo de grupos prostéticos del enzima*

Los resultados del análisis de grupos prostéticos de dos preparaciones de nitrato reductasa se presentan en la Tabla IX. El contenido molecular (mol/mol enzima) mínimo se presenta en las últimas columnas, tomando 467.400 como el peso molecular del enzima (ver apdo. III.C.). Los valores obtenidos muestran que la nitrato reductasa de *A. braunii* contiene 4 moléculas de FAD y 4 citocromos, además de 2 átomos de molibdeno.

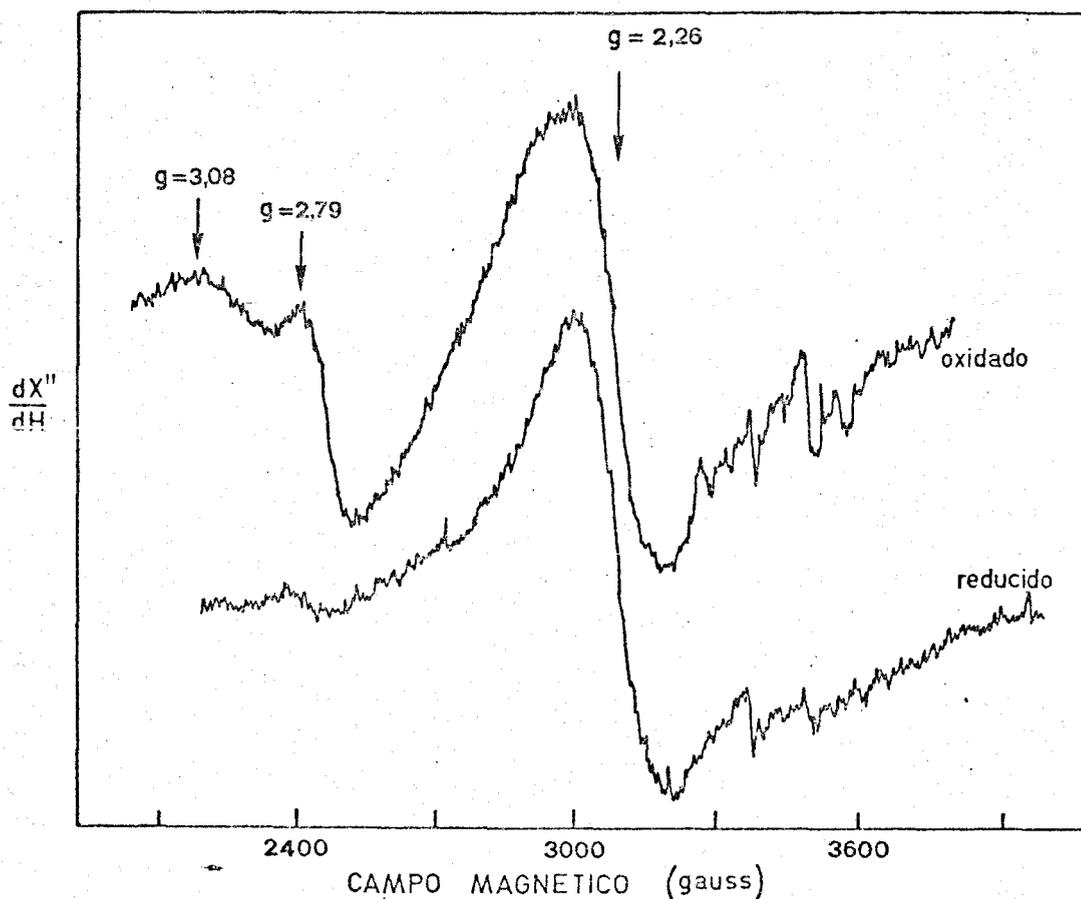


Figura 27. Espectros de resonancia paramagnética del electrón (EPR) de la nitrato reductasa en presencia o ausencia de ditionito. La línea superior muestra el espectro de EPR del enzima nativo y oxidado, mientras que la línea inferior corresponde al espectro del enzima reducido por adición de ditionito sódico. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

TABLA IX

COMPOSICION DE GRUPOS PROSTETICOS DE LA NITRATO REDUCTASA

Componente prostético	nmol/mg proteína			mol/mol enzima	
	I	II	media	datos analíticos	deducido de los datos
FAD	nd <sup>a</sup>	7,45	7,45	3,48	4
hierro hemínico	7,89	8,25	8,07	3,77	4
molibdeno	3,65	2,98	3,32	1,56	2
hierro total	11,93	9,24	10,59	4,95	4
sulfuro lábil	nd <sup>a</sup>	0	0	0	0

a) nd = no determinado

### III.E. DETERMINACION DE LA SECUENCIA DEL TRANSPORTE DE ELECTRONES DESDE EL NAD(P)H HASTA EL NITRATO

Una vez determinados los grupos prostéticos de la nitrato reductasa de *A. braunii* como FAD, hemo y molibdeno (apdos. III.D.2., III.D.3. y III.D.5.), el número de moléculas o átomos de cada uno de ellos por molécula de enzima (apdo. III.D.6.), y puesto de manifiesto la funcionalidad de dichos grupos en el enzima (apdos. III.D.2 y III.D.4.), quedaba por dilucidar el orden en que estos componentes prostéticos intervienen en el transporte de electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato.

#### III.E.1. *Requerimiento de grupos sulfhidrilos libres para la reducción con NAD(P)H del hemo de la nitrato reductasa*

La incubación de la nitrato reductasa con pHMB 0,1 mM inactiva completamente todas las actividades del complejo enzimático dependientes de NAD(P)H, sin producir cambios apreciables en el espectro visible de absorción del enzima nativo. Por otra parte, el ditionito, pero no el NAD(P)H, es capaz de reducir el cromóforo hemo del enzima tratado con pHMB, como se muestra en la Fig. 28. Estos resultados demuestran la esencialidad de los grupos sulfhidrilos libres en el enzima para que el NAD(P)H pueda reducir al citocromo  $b_{557}$ , apoyando la idea sugerida en el apdo. III.B.5. de que la nitrato reductasa de *A. braunii* posee grupos -SH en su sitio activo para el NAD(P)H.

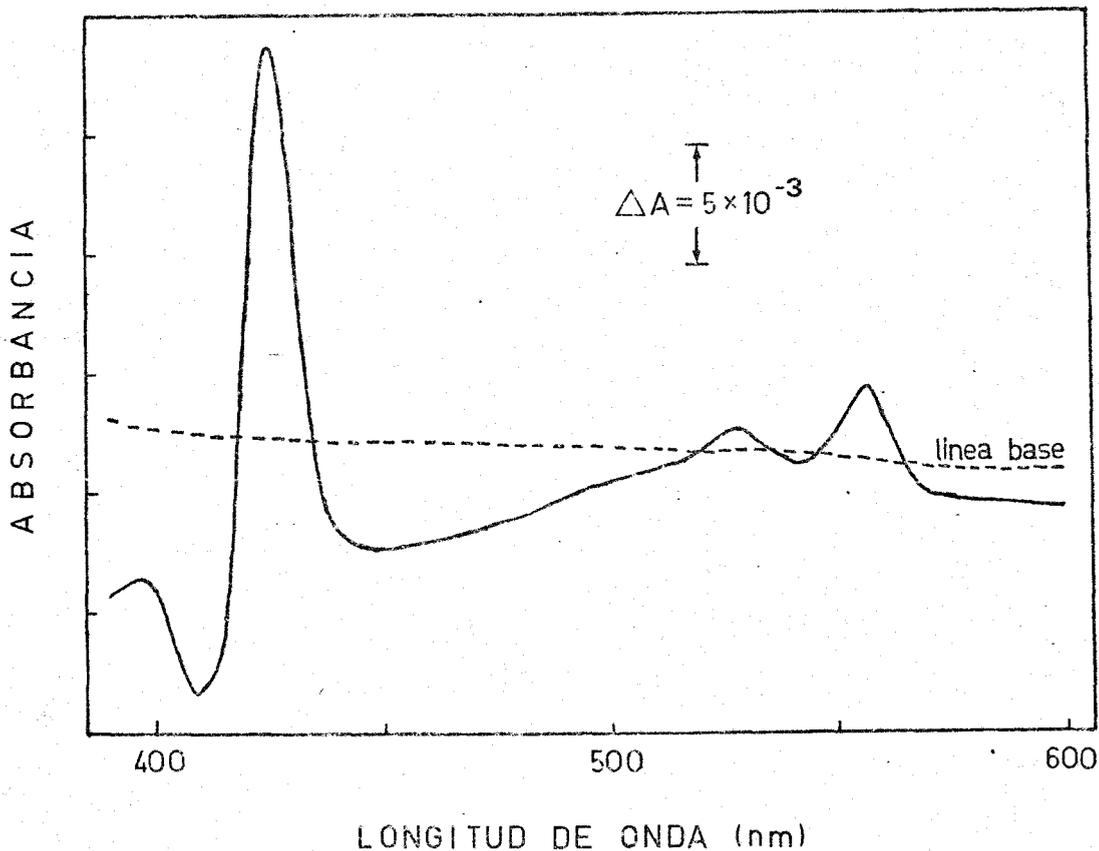


Figura 28. Espectro diferencial de la nitrato reductasa tratada con pHMB, después de la adición de ditionito sódico a la muestra y de NAD(P)H a la referencia. Ambas cubetas contenían 1,0 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0) con 0,05 mg de nitrato reductasa y EDTA 0,10 mM. Las soluciones se incubaron durante 30 min a 0°C en presencia de pHMB 0,1 mM. A continuación, unos cristallitos de ditionito sódico y de NAD(P)H se añadieron a las cubetas muestra y referencia, respectivamente. El espectro diferencial entre ambas soluciones se registró tan pronto como fue posible.

### III.E.2. *Participación de la flavina en la reducción por NAD(P)H del citocromo de la nitrato reductasa*

El grupo prostético flavínico de la nitrato reductasa de organismos eucarióticos parece estar situado antes del cromóforo hemínico en la secuencia del transporte de electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato (Guerrero *et al*, 1981; Hewitt *et al*, 1976). En base a ello se intentó estudiar espectrofotométricamente el requerimiento de flavina en el enzima para reducir el citocromo  $b_{557}$ . Los resultados de la Fig. 29 muestran que el NADH es incapaz de reducir el hemo de la nitrato reductasa de *A. braunii* cuando ésta ha sido liberada de su flavina por diálisis prolongada (apdo. III.D.3.), mientras que la adición posterior de ditionito conduce a la reducción del citocromo. Similar requerimiento de FAD para la reducción del citocromo  $b_{557}$  por NADH se ha observado en otras nitrato reductasas (Garrett y Nason, 1969; Guerrero y Gutiérrez, 1977).

### III.E.3. *Determinación del potencial normal del citocromo $b_{557}$ de la nitrato reductasa*

El potencial normal de citocromo  $b_{557}$  se determinó usando 0,21 mg de nitrato reductasa de *A. braunii*, según se describe en Materiales y Métodos. La titulación reductiva se llevó a cabo añadiendo pequeñas alícuotas de una solución de ditionito sódico 50 mM, registrándose los cambios de la absorbancia

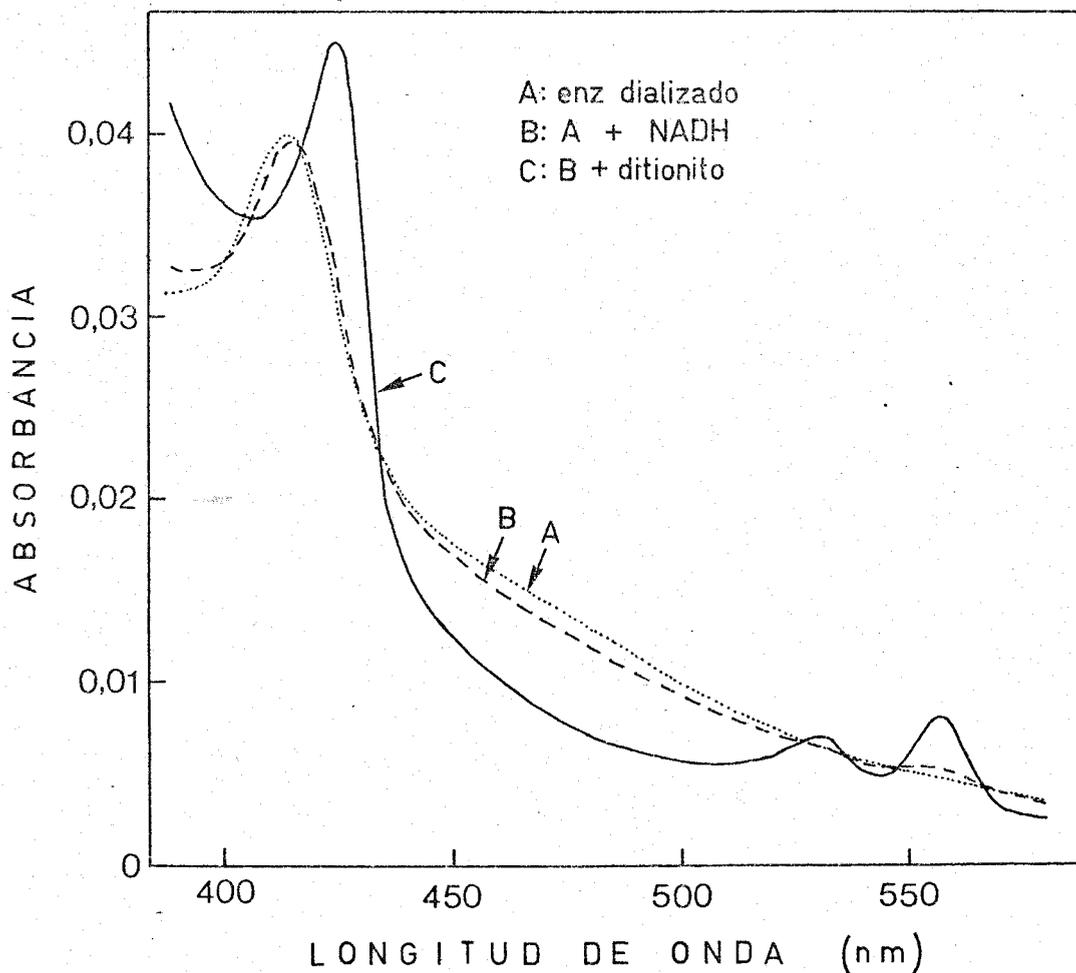


Figura 29. Efecto de la diálisis prolongada sobre la reducibilidad por NADH del hemo unido a la nitrato reductasa. Una muestra de 0,5 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) conteniendo 0,04 mg de nitrato reductasa, se dializó exhaustivamente frente a 5 l del mismo tampón. El espectro de absorción de la solución enzimática dializada se realizó después de las siguientes adiciones: A, ninguna; B, unos cristallitos de NADH; y C, unos cristallitos de ditionito sódico.

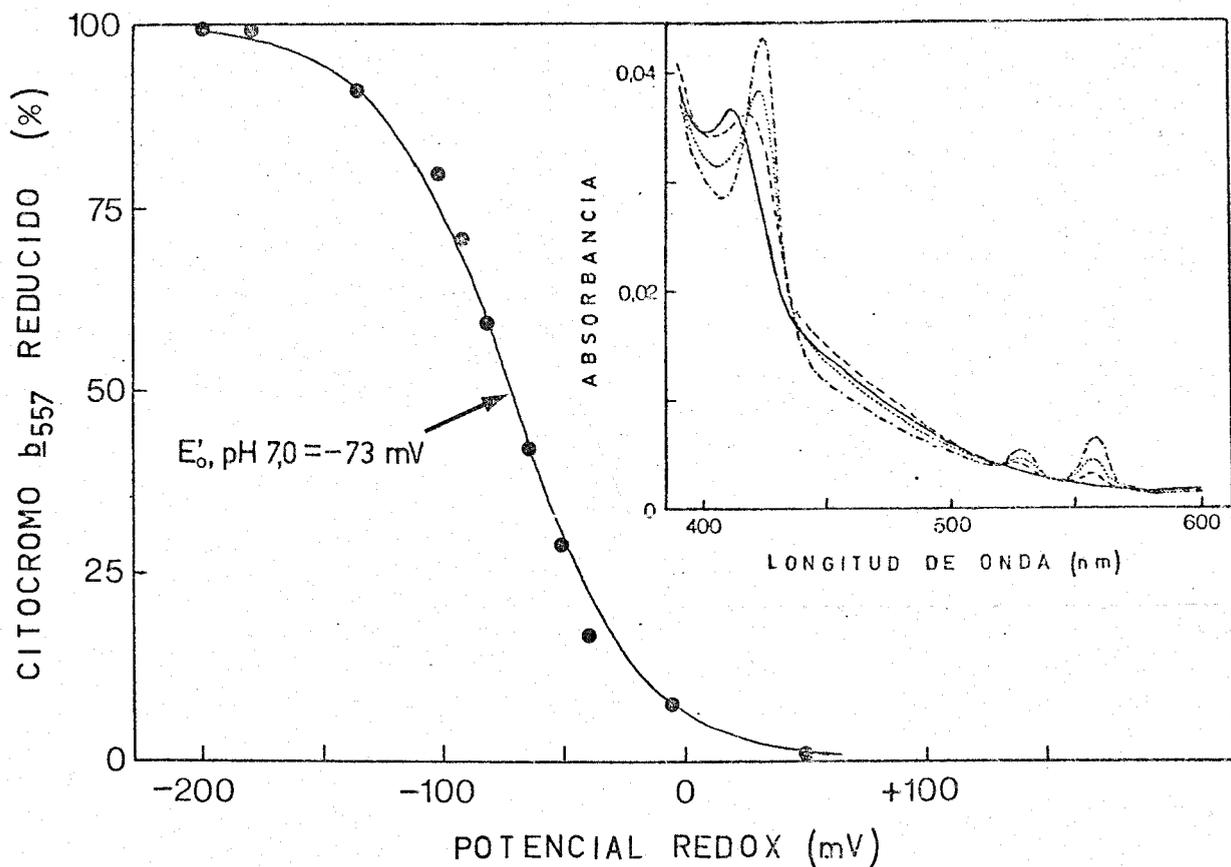


Figura 30. *Titulación reductiva del citocromo b<sub>557</sub> de la nitrato reductasa.* 3,0 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M (pH 7,0) conteniendo 0,21 mg de nitrato reductasa, EDTA 0,10 mM y los mediadores redox, se sometieron a una titulación reductiva con ditionito sódico. Los detalles del procedimiento se describen en Materiales y Métodos. La línea continua representa la curva teórica suponiendo  $n=1$ , mientras que los círculos negros corresponden a los datos experimentales. Similares resultados se obtuvieron cuando la titulación se realizó en sentido inverso con ferricianuro. En el recuadro interno se presentan los distintos espectros de absorción de una solución  $8 \cdot 10^{-2} \mu\text{M}$  de nitrato reductasa después de la adición sucesiva de pequeñas alícuotas de ditionito.

y del potencial redox simultáneamente. Después de cada adición, las lecturas se hicieron al cabo de unos minutos, necesarios para que el potencial llegara a estabilizarse. La representación de la cantidad de citocromo reducido frente al potencial redox se muestra en la Fig. 30. Los resultados se ajustan bastante bien a una titulación de  $n=1$ , con un potencial normal a pH 7,0 de  $-73$  mV.

### III.F. DETERMINACION DE LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO ENZIMATICO NITRATO REDUCTASA DE *A. braunii*.

#### III.F.1. *Micrografía electrónica de la nitrato reductasa teñida negativamente*

El ensamblaje tridimensional de las ocho subunidades de la nitrato reductasa de *A. braunii* se estudió por microscopía electrónica, según se indica en Materiales y Métodos. La Fig. 31 muestra un espécimen de enzima teñido negativamente con acetato de uranilo, apareciendo unas moléculas en forma de anillo como las estructuras más prominentes. Además, aparecen unas moléculas más pequeñas de forma menos definida que probablemente corresponden a moléculas de enzima con algunas de sus subunidades disociadas. La fijación de la preparación de enzima con formaldehído antes de la tinción con acetato de uranilo no mejoró las imágenes de las moléculas de enzima, ni incrementó el número de moléculas intactas.

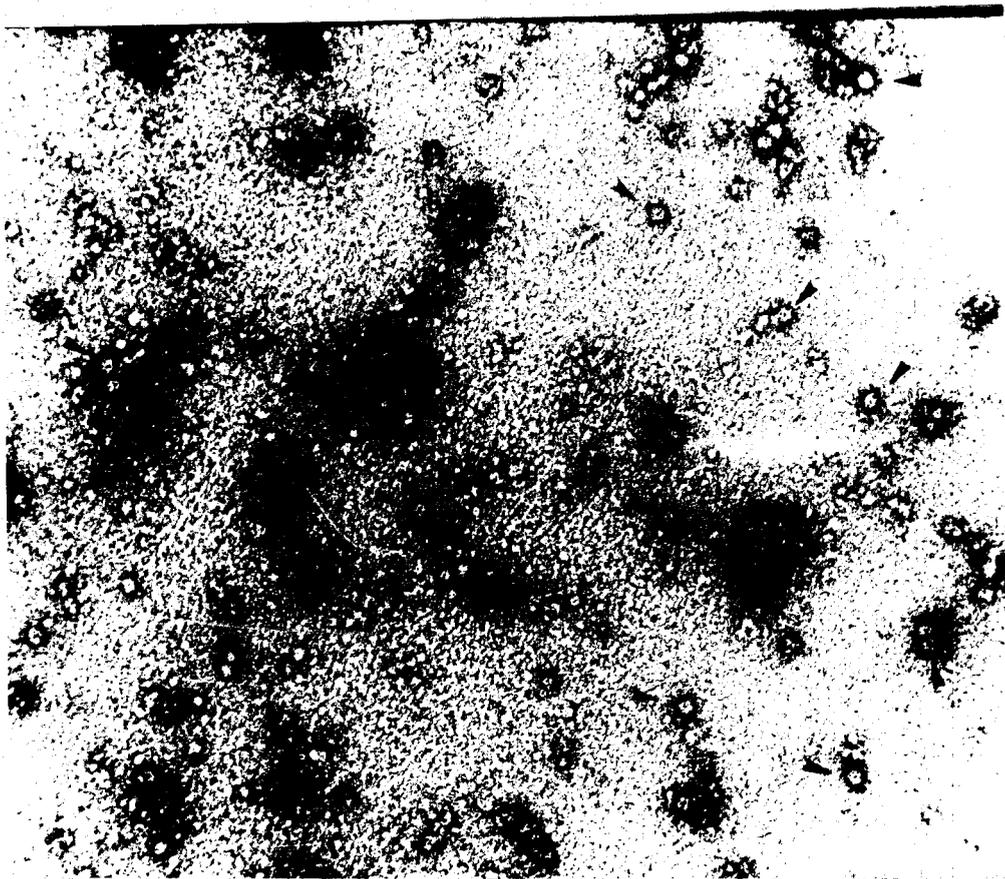


Figura 31. *Micrografía electrónica de la nitrato reductasa de A. braunii.* El espécimen de nitrato reductasa (0,09 mg/ml) se tiñó negativamente con una solución de acetato de uranilo al 2% en agua. La magnificación fue de 290.000. Las flechas localizan algunas moléculas del enzima.

### III.F.2. *Procesamiento rotacional de imágenes de la nitrato reductasa por superposición óptica*

Para poner de manifiesto la presencia de algún tipo de simetría en la molécula de enzima, la imagen de una molécula altamente aumentada se sometió al proceso de rotación por superposición óptica ( Fig. 32). La rotación con un ángulo de  $45^\circ$  ( $n=8$ ) es la única que dá un reforzamiento en la intensidad de las imágenes, así como una periodicidad clara y una distribución de intensidades discernible en la molécula. La rotación empleando otras fracciones de  $360^\circ$  resulta en un fuerte obscurecimiento de las imágenes y dan menos información que la original (Fig. 32). Solamente la rotación de  $90^\circ$  muestra una imagen aceptable, como sería de esperar con una simetría rotacional de ocho veces.

### III.F.3. *Micrografía electrónica de la nitrato reductasa según la técnica sandwich*

El enzima también se visualizó empleando la técnica *sandwich*, consistente en fijar la molécula de enzima entre dos capas de carbón. En la imagen que aparece en la Fig. 33 se pueden identificar ocho subunidades que ocupan alternativamente dos planos diferentes. La molécula aparece ligeramente distorsionada debido a una subunidad del plano superior que se encuentra desplazada hacia afuera del anillo octamérico.

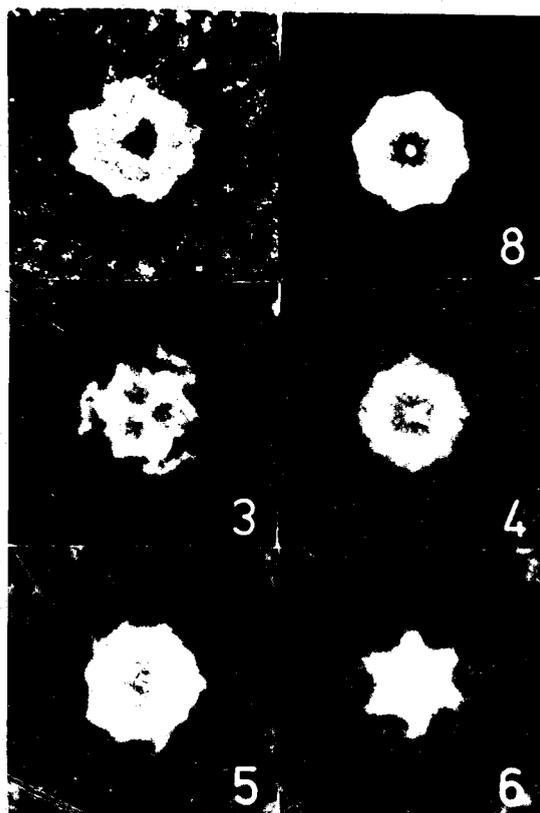


Figura 32. *Procesamiento rotacional de imágenes de la nitrato reductasa por superposición óptica.* En la figura superior izquierda se presenta la micrografía electrónica original de una molécula de nitrato reductasa (magnificación 1.200.000) que se usó para el procesamiento. Solamente la rotación con un ángulo de  $45^\circ$  (foto superior derecha) mejoró la imagen original. Las cuatro micrografías inferiores corresponden a otras periodicidades ( $360 \cdot n^{-1}$ , donde  $n = 3, 4, 5$  y  $6$ ), las cuales obscurecen la imagen y dan menos información que la original. Las fotografías correspondientes a  $n = 7$  y  $9$  fueron similares a las de  $n = 5$  y  $6$ .

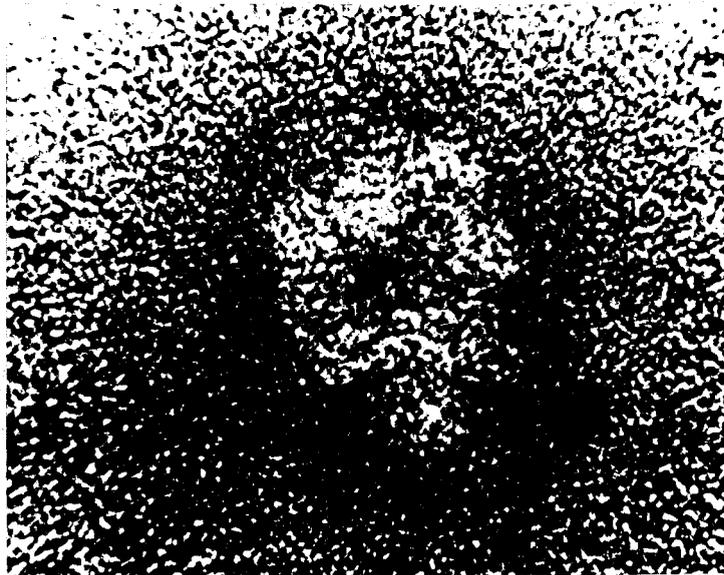


Figura 33. *Micrografía electrónica de una molécula de nitrato reductasa entre dos capas de carbón. Se observan ocho subunidades que parecen ocupar dos planos diferentes. Una subunidad del plano superior aparece desplazada hacia afuera, probablemente debido a la técnica de sandwich empleada. La magnificación fue de 2.000.000.*

#### III.F.4. *Modelo tentativo de la estructura de la nitrato reductasa*

Combinando los resultados obtenidos para la composición de subunidades del enzima (apdo. III.C.3.) y los estudios al microscopio electrónico aquí presentados, se sugiere un modelo para la nitrato reductasa de *A. braunii* como el que aparece en la Fig. 34. Dicho modelo propone una estructura circular con una simetría rotacional de ocho veces. Si esta estructura es la forma estable del enzima o es una consecuencia del procedimiento de tinción queda pendiente de posterior investigación. Por otra parte, el complejo enzimático parece disociar fácilmente sus subunidades, como se deduce de los fragmentos que aparecen en la Fig. 31 y del desplazamiento de las subunidades en la Fig. 33.

#### III.G. INTERCONVERSION POR OXIDO-REDUCCION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. braunii*

##### III.G.1. *Requerimiento de oxígeno para la inactivación de la nitrato reductasa por incubación con NADH.*

La Fig. 35 muestra que la presencia de oxígeno es condición *sine qua non* para conseguir una completa inactivación *in vitro* de la actividad NADH-nitrato reductasa, por incubación de

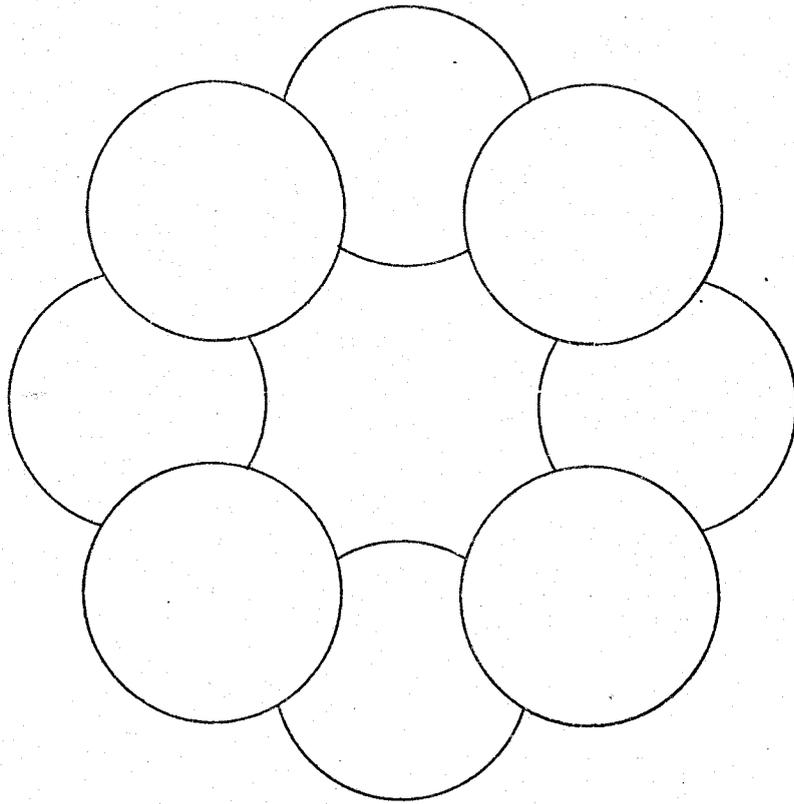


Figura 34. *Modelo tentativo de la nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii*

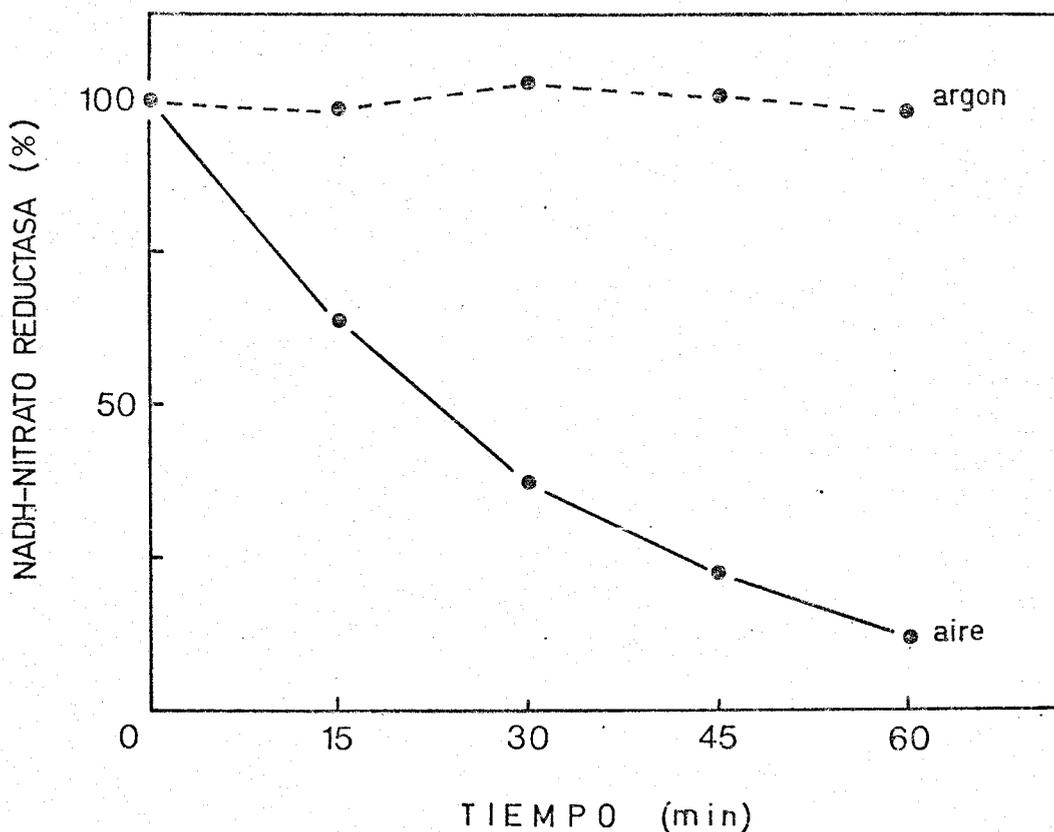


Figura 35. Efecto de la anaerobiosis sobre la inactivación por NADH de la nitrato reductasa. Dos muestras de 1 ml contenían 10  $\mu$ g de nitrato reductasa purificada, 0,1 mmol de tampón Tris-HCl (pH 7,5) y 10  $\mu$ mol de  $MgCl_2$ . Una de las soluciones se hizo anaeróbica con argon, según se describe en Materiales y Métodos, y a continuación se añadieron 20  $\mu$ l de una solución también anaeróbica de NADH 30 mM a cada una de las dos muestras enzimáticas. Se incubaron a 0°C y, a los tiempos indicados, la actividad NADH-nitrato reductasa se midió por adición de 0,05 ml de cada preincubación a los reactivos del ensayo estándar.

la nitrato reductasa con NADH a 0°C. Si la incubación se realiza bajo una atmósfera inerte de argón, la actividad enzimática permanece alta, mientras que si se lleva a cabo en una atmósfera de aire la inactivación de la nitrato reductasa es superior al 90% al final de experimento.

### III.G.2. *Efecto de la presión parcial de oxígeno en la inactivación de la nitrato reductasa con NADH*

En la Fig. 36 aparecen los resultados obtenidos al incubar la nitrato reductasa con NADH en atmósferas con diferentes presiones parciales de oxígeno. Estos resultados indican que el proceso de inactivación del enzima con NADH depende directamente de la concentración de oxígeno en la atmósfera, siendo máxima cuando la incubación se realiza en presencia de aire (oxígeno al 20%). A concentraciones superiores de oxígeno la inactivación por NADH es menos efectiva, siendo prácticamente nula en una atmósfera de oxígeno puro.

### III.G.3. *Requerimiento de la actividad diaforasa del complejo enzimático para su inactivación por NADH.*

Los resultados presentados en la Tabla X muestran que es necesario que la actividad diaforasa del complejo enzimático nitrato reductasa sea funcional para obtener una efectiva inactivación del enzima por NADH. El piridín nucleótido es incapaz

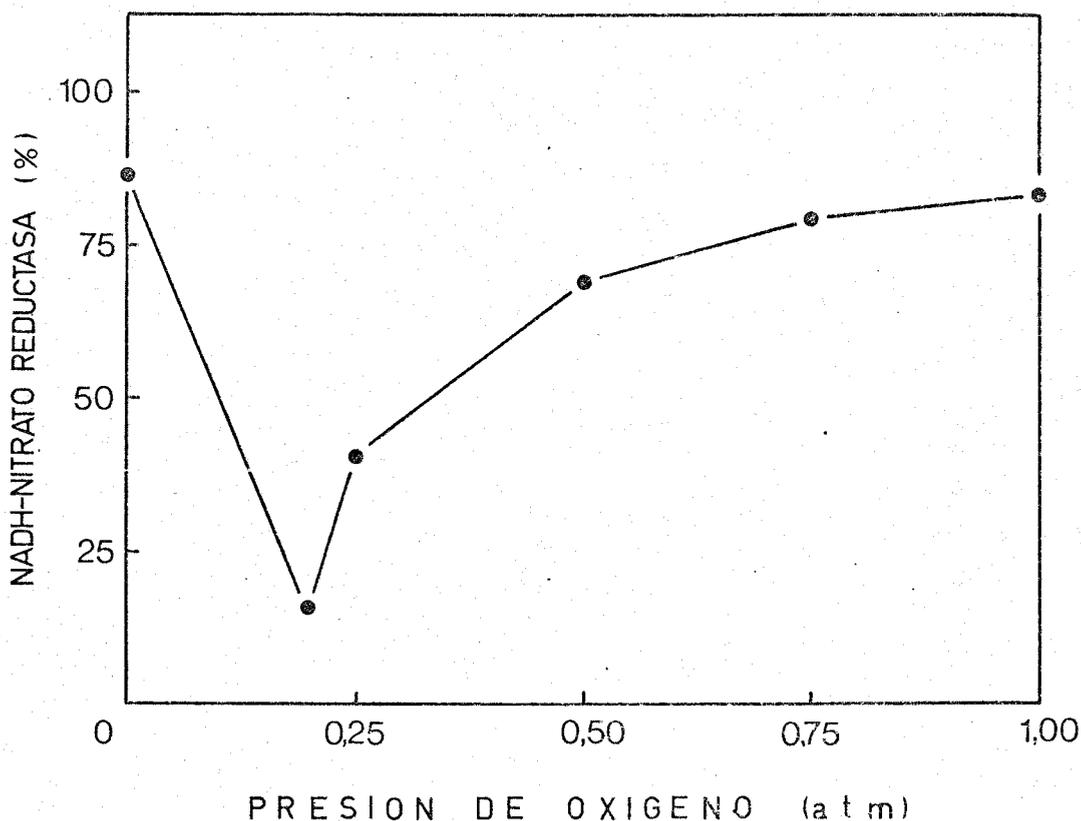


Figura 36. Efecto de la presión parcial de oxígeno sobre la inactivación por NADH de la nitrato reductasa. Seis muestras de 1 ml conteniendo 12  $\mu$ g de nitrato reductasa purificada, FAD 20  $\mu$ M y  $MgCl_2$  10 mM en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5), se evacuaron a 0°C con una bomba de vacío. La presión atmosférica se restauró con una mezcla de argón/oxígeno en la proporción indicada en la Fig. para cada muestra (la presión de 1 atm corresponde al 100% de oxígeno), según se describe en Materiales y Métodos. Después de ello, 20  $\mu$ l de una solución anaeróbica de NADH 30 mM se añadieron a cada solución enzimática. Se incubaron a 0°C durante 45 min y se midió la actividad de cada preincubación por adición de 0,05 ml a los reactivos del ensayo estándar.

TABLA X

REQUERIMIENTO DE ACTIVIDAD DIAFORASA PARA INACTIVAR LA NITRATO REDUCTASA CON NADH

Sistema de preincubación	MVH-nitrato reductasa (%)
Enz (diaforasa inactiva)	100
Enz (diaforasa activa)	102
Enz (diaforasa inactiva) + NADH	85
Enz (diaforasa activa) + NADH	32

Cuatro muestras de 1 ml contenían 7  $\mu$ g de nitrato reductasa purificada, 2  $\mu$ mol de EDTA y 0,1 mmol de tampón Tris-HCl (pH 7,5). Dos de ellas se incubaron a 45°C durante 15 min (enzima con diaforasa inactiva), mientras que las otras dos se conservaron a 0°C (enzima con diaforasa activa). A continuación se añadió a cada muestra 10  $\mu$ l de FAD 2 mM, 10  $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1 M y 20  $\mu$ l de NADH 30 mM. Después de 60 min a 0°C, se midió la actividad MVH-nitrato reductasa añadiendo 0,05 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo estándar.

de inactivar a la nitrato reductasa cuando ésta pierde su actividad diaforasa al calentar el enzima a 45°C durante 15 min en tampón sin FAD (De la Rosa, 1975; Barea *et al*, 1976a). Estos resultados pueden interpretarse asumiendo que dicha actividad es necesaria, bien para que se reduzca el sitio donde se afecta el enzima al inactivarse o bien para la producción del radical superóxido, como se discutirá más adelante.

#### III.G.4. *Inactivación de la nitrato reductasa por NADH. Protección por ditionito o superóxido dismutasa y estimulación por FAD.*

La inclusión de ditionito, poderoso agente reductor que elimina todo el oxígeno disuelto en la mezcla de incubación haciéndola por tanto anaeróbica, impide la inactivación de la nitrato reductasa por el NADH. Por otra parte, cuando la superóxido dismutasa se incluye en la mezcla de reacción aeróbica del enzima con NADH, la actividad es completamente protegida frente a la inactivación promovida por el NADH (Tabla XI), indicando que el radical superóxido ( $O_2^-$ ) está probablemente involucrado en el mecanismo de inactivación.

El FAD, cofactor fisiológico del enzima y eficaz agente productor de  $O_2^-$  por reducción de  $O_2$  en las flavoproteínas con actividad oxidasa (Massey *et al*, 1971; Fridovich, 1974), potencia el efecto inactivante del piridín nucleótido sobre la nitrato reductasa (Tabla XI).

TABLA XI

INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR NADH. PROTECCION POR DITIONITO O SUPEROXIDO DISMUTASA Y ESTIMULACION POR FAD

Sistema de preincubación	Actividad relativa (%)
Enzima	100
Enz + NADH	44
Enz + FAD	93
Enz + NADH + FAD	23
Enz + S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	99
Enz + FAD + S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	97
Enz + NADH + FAD + S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	112
Enz + superóxido dismutasa	102
Enz + NADH + FAD + superóxido dismutasa	98

Varias soluciones de nitrato reductasa purificada conteniendo cada 15 µg de proteína, se incubaron en un volumen final de 1 ml con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) y, donde se indica, NADH 0,6 mM, FAD 0,2 mM, ditionito sódico 20 mM y 15.000 U de superóxido dismutasa. Después de 30 min a 0°C, la actividad NADH-nitrato reductasa se midió añadiendo 0,05 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo estándar.

III.G.5. *Efecto del manitol y del etanol sobre la inactivación del enzima por NADH*

El manitol y el etanol, dos conocidos agentes eliminadores (*scavengers*) de radicales hidroxilo ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) (Halliwell, 1977; Cohen y Heikkila, 1977), no ejercen ningún efecto sobre la inactivación de la nitrato reductasa por NADH (Tabla XII). Así pues, los radicales  $\text{OH}^{\cdot}$ , que con toda seguridad se forman en la mezcla de reacción por interacción de la flavina reducida del enzima con el oxígeno (Halliwell, 1977), no intervienen en el proceso de inactivación del enzima con NADH.

III.G.6. *Protección por nitrato y cianato frente a la inactivación por NADH de la nitrato reductasa*

El nitrato, aceptor fisiológico de electrones de la nitrato reductasa, y el cianato, inhibidor competitivo respecto al nitrato, protegen eficazmente al enzima frente a la inactivación por NADH (Tabla XIII), lo que indica que la modificación que ocurre en la nitrato reductasa y que conduce a su inactivación puede tener lugar en un grupo estrechamente relacionado con el sitio activo donde se une el nitrato.

III.G.7. *Reactivación por nitrato del enzima inactivado por incubación con NADH*

TABLA XII

EFFECTO DEL MANITOL Y DEL ETANOL SOBRE LA INACTIVACION POR NADH DE LA NITRATO REDUCTASA

Sistema de preincubación	Actividad relativa (%)
Enzima	100
Enz + NADH	24
Enz + NADH + manitol	19
Enz + NADH + etanol	11

Las mezclas de incubación incluían, en un volumen final de 1 ml, 8 µg de nitrato reductasa purificada, 0,1 mmol de tampón Tris-HCl (pH 7,5), 10 µmol de MgCl<sub>2</sub>, 20 nmol de FAD y, donde se indica, 10 µmol de manitol o 10 µmol de etanol. Después de 10 min de incubación a 0°C, se midió la actividad NADH-nitrato reductasa añadiendo 0,05 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo estándar.

TABLA XIII

PROTECCION POR NITRATO O CIANATO FRENTE A LA INACTIVACION POR NADH DE LA NITRATO REDUCTASA

Sistema de preincubación	Actividad relativa (%)
Enzima	100
Enz + $\text{NO}_3^-$	103
Enz + $\text{CNO}^-$	98
Enz + NADH	11
Enz + NADH + $\text{NO}_3^-$	98
Enz + NADH + $\text{CNO}^-$	95

Muestras conteniendo 18  $\mu\text{g}$  de nitrato reductasa purificada se incubaron en un volumen final de 1 ml con tampón Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) y, donde se indica, nitrato potásico 1,5 mM, cianato potásico 50  $\mu\text{M}$  y NADH 0,6 mM. Después de 60 min a 0°C, la actividad NADH-nitrato reductasa se midió añadiendo 0,05 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo estándar.

Una preparación de nitrato reductasa inactivada por incubación aeróbica con NADH se filtró a través de una columna (1 x 13 cm) de Sephadex G-25 para eliminar el exceso de NADH. Posteriormente se incubó con nitrato, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig 37, e indican que el nitrato es capaz de promover la recuperación de la actividad enzimática de la nitrato reductasa inactiva. Por otra parte, las condiciones anaeróbicas mejoran significativamente la reactivación del enzima por el nitrato, las cuales por sí mismas son incapaces de reactivar el enzima sin la participación del nitrato. De cualquier forma, el nitrato no es tan eficiente como el ferricianuro en el papel de oxidante-activador de la nitrato reductasa inactiva.

### III.G.8. *Localización del centro de inactivación del complejo nitrato reductasa a lo largo de su cadena de transporte*

Según hemos expuesto anteriormente, la incubación aeróbica con NADH de la nitrato reductasa da lugar a un enzima carente de actividad nitrato reductasa terminal, cuya actividad NAD(P)H-diaforasa permanece funcional. Después de eliminar el piridín nucleótido por filtración de la mezcla de incubación a través de una columna (1 x 13 cm) de Sephadex G-25, el enzima permanece inactivo y presenta el citocromo  $b_{557}$  en su forma oxidada, según se pudo comprobar espectrofotométricamente. La adi-

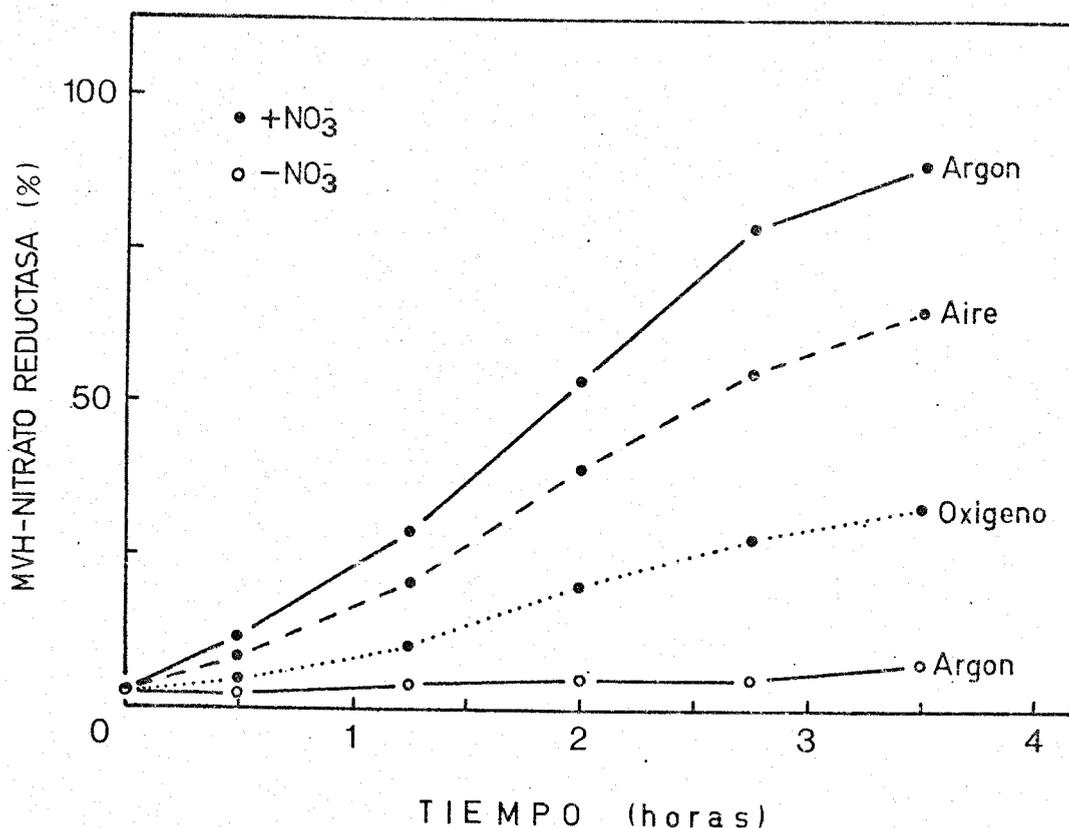


Figura 37. *Reactivación por nitrato de la nitrato reductasa inactivada con NADH.* Muestras de 1 ml conteniendo 12  $\mu\text{g}$  de nitrato reductasa, previamente inactivada por incubación con NADH, y dializadas exhaustivamente para eliminar el exceso de piridín nucleótido frente a tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) conteniendo FAD 20  $\mu\text{M}$ , se evacuaron a  $0^\circ\text{C}$  con una bomba de vacío. Posteriormente se restauró la presión atmosférica con argón, aire u oxígeno según el caso. Este proceso se repitió tres veces. Después de añadir 0,1 ml de una solución anaeróbica de nitrato potásico 1 M, las muestras enzimáticas se incubaron a  $30^\circ\text{C}$ . La actividad enzimática, medida a los tiempos indicados tomando alícuotas de 0,05 ml, se presenta en la Fig. como el tanto por ciento de aquélla obtenida en cada momento después de la reactivación con ferricianuro.

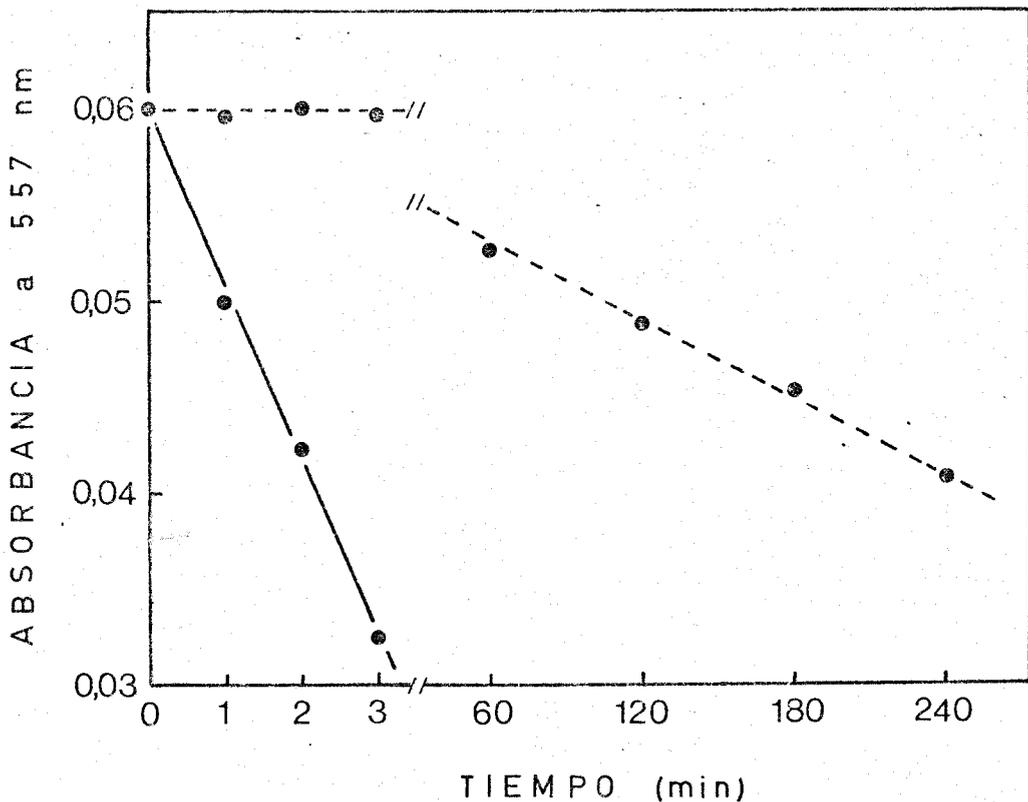


Figura 38. Reoxidación por nitrato del citocromo  $b_{557}$  de la nitrato reductasa activa o inactivada con NADH. Dos preparaciones de enzima purificado contenían 0,20 mg de proteína en 1 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,5). Una de ellas se inactivó previamente por incubación con NADH, el cual se eliminó posteriormente por filtración en una columna de Sephadex G-25, mientras que la nitrato reductasa de la otra preparación se mantuvo activa. Ambas muestras se redujeron con una pequeña cantidad de NADH, y a continuación se añadió nitrato potásico en exceso. La velocidad de reoxidación del grupo cromóforo hemo (disminución de la absorbancia a 557 nm) se siguió en el enzima activo (—) y en el inactivo (----) a temperatura ambiente.

ción de una pequeña cantidad de NADH da lugar a la rápida reducción del citocromo del enzima inactivo, exactamente igual que ocurre en otra preparación de nitrato reductasa activa. Por el contrario, la posterior adición de nitrato provoca una rápida reoxidación del cromóforo hemo en el enzima activo, mientras que en el enzima inactivo la reoxidación tarda varias horas en completarse (Fig. 38). Estos resultados indican que la nitrato reductasa inactivada con NADH presenta un bloqueo situado en un punto posterior al citocromo  $b_{557}$  en su cadena transportadora de electrones.

### III.G.9. *Estudio potenciométrico del proceso de inactivación de la nitrato reductasa*

El cianuro, conocido agente quelante de metales como el hierro y el molibdeno, conduce a la inactivación de la nitrato reductasa de *A. braunii* cuando ésta se incuba con cianuro en presencia de ditionito (Tabla XIV). El enzima inactivado en estas condiciones recupera su actividad original cuando se trata con ferricianuro (no mostrado).

Por otra parte, y para poner de manifiesto de una forma directa que la inactivación de la nitrato reductasa supone básicamente una reducción del enzima, se incubó la nitrato reductasa de *A. braunii* en presencia de una determinada concen-

TABLA XIV

INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR DITIONITO Y CIANURO

Sistema de preincubación	Actividad relativa (%)
Enzima	100
Enz + $S_2O_4^{=}$	105
Enz + $CN^-$	98
Enz + $S_2O_4^{=}$ + $CN^-$	12

Las mezclas de incubación contenían, en un volumen final de 0,8 ml: 0,7  $\mu$ g de nitrato reductasa purificada, 0,1 mmol de tampón Tris-HCl (pH 7,5) y, donde se indica, 4,6  $\mu$ mol de ditionito sódico y 2  $\mu$ mol de cianuro potásico. Después de 15 min a 30°C, se añadieron 0,1 ml de nitrato potásico 0,1 M y 0,1 ml de metil viológeno 1,5 mM para completar el ensayo estándar de actividad MVH-nitrato reductasa. Las soluciones enzimáticas se incubaron durante 5 min más a 30°C, y el nitrito formado se midió según se describe en Materiales y Métodos.

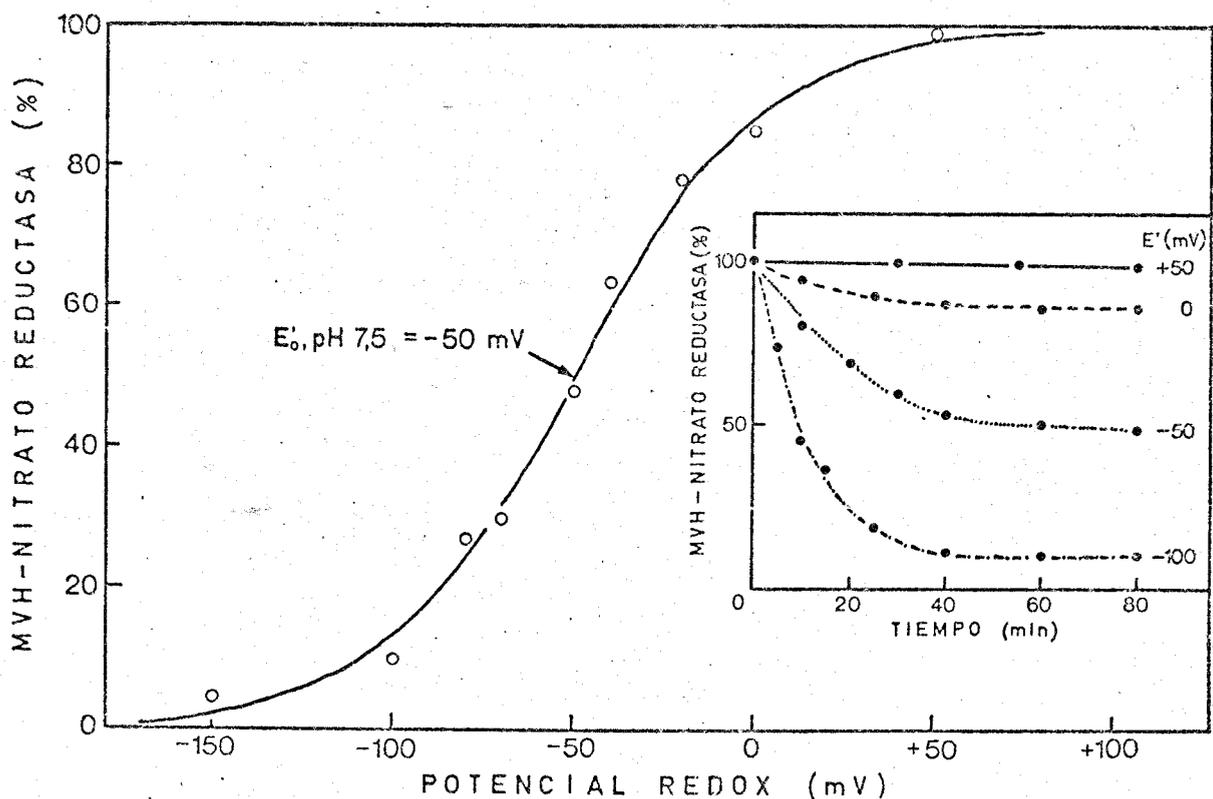


Figura 39. Titulación redox del proceso de inactivación de la nitrato reductasa por ditionito y cianuro. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 4 ml, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), los mediadores redox y KCN 2  $\mu\text{M}$ . El potencial redox de la solución se ajustó al valor deseado con una solución de ditionito sódico 50 mM, y a continuación se añadieron 14  $\mu\text{g}$  de nitrato reductasa con una jeringa. La mezcla de reacción se incubó en condiciones anaeróbicas con agitación continua a 30°C, y la actividad MVH-nitrato reductasa se midió a los tiempos indicados añadiendo 0,2 ml de la solución enzimática a los reactivos del ensayo estándar. Otras condiciones se detallan en Materiales y Métodos. La actividad (O) después de estabilizarse se representa en la Fig. frente al potencial redox correspondiente, siendo la línea continua la curva teórica suponiendo  $n=1$ . En el recuadro interno se presentan las cinéticas de inactivación por cianuro de la nitrato reductasa a diferentes potenciales redox.

tración de cianuro y se ajustó el potencial redox de la solución con ditionito a un valor deseado, siguiéndose en cada caso la cinética de inactivación del enzima. Los resultados obtenidos aparecen en la Fig. 39, donde puede observarse que la inactivación con ditionito y cianuro es un proceso que depende del potencial redox de la mezcla de incubación, e implica una reducción donde se transfiere un solo electrón. El potencial normal de óxido-reducción, a pH 7,5, calculado para el proceso de inactivación del enzima es igual a -50 mV.

### III.G.10. *Estudio potenciométrico del proceso de reactivación de la nitrato reductasa*

La nitrato reductasa previamente inactivada con ditionito y cianuro y posteriormente dializada para eliminar el exceso de reactivos, se incubó a distintos potenciales redox en presencia de ferricianuro. En cada incubación se siguió la cinética de reactivación (Fig. 40, recuadro interno), y se observó que el proceso de reactivación con ferricianuro es dependiente del potencial redox, tratándose por tanto de una reacción de oxidación del enzima en la que se intercambia un solo electrón. El potencial normal de óxido-reducción calculado para el proceso de activación del enzima, a pH 7,5, es +230 mV (Fig. 40). Similar potencial normal se obtuvo cuando el enzima utilizado había sido inactivado por incubación aeróbica con NADH, en vez de con ditionito y cianuro, lo cual hace pensar que el grupo que se reduce en el enzima al inacti-

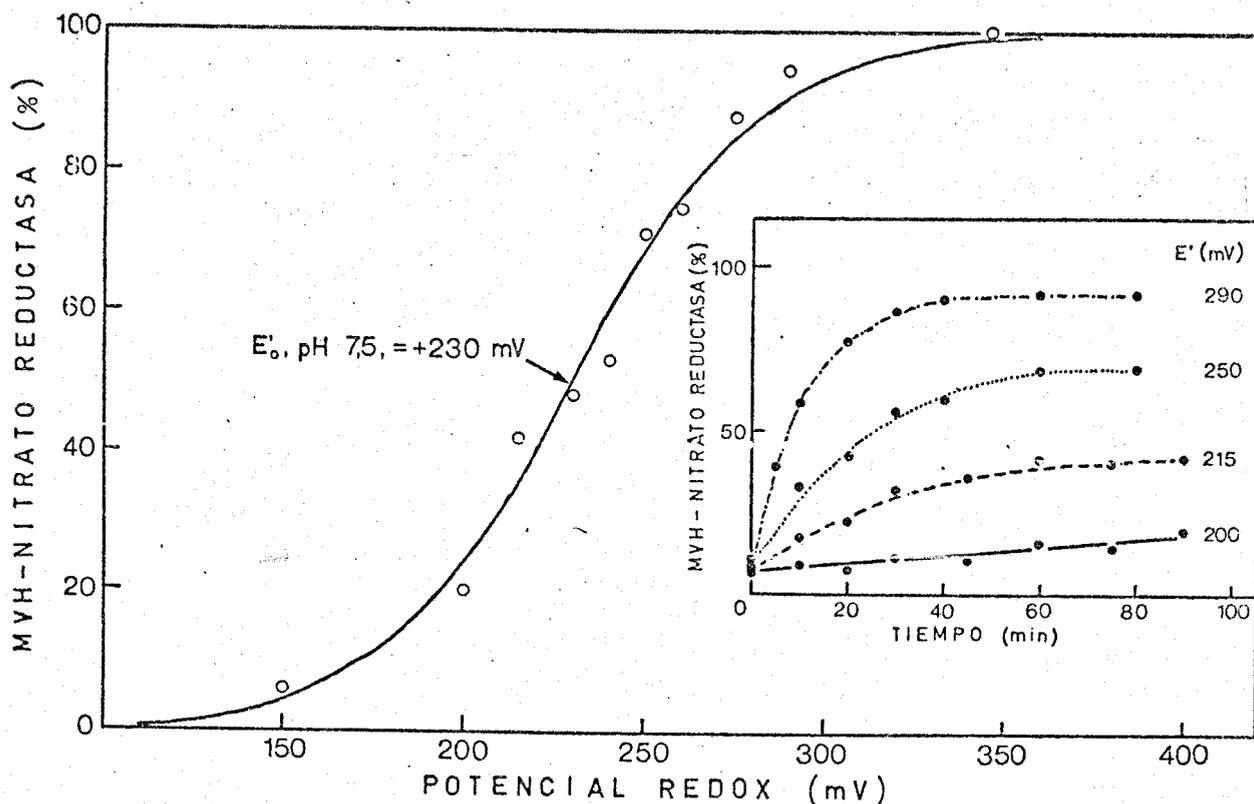


Figura 40. Titulación redox del proceso de reactivación con ferricianuro de la nitrato reductasa inactiva. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 4 ml, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) y los mediadores redox. Su potencial redox se llevó hasta -150 mV aproximadamente con una solución de ditionito 50 mM. 13  $\mu$ g de nitrato reductasa inactiva —el enzima había sido previamente inactivado por incubación con ditionito 4,6 mM y cianuro 3  $\mu$ M durante 20 min a 30°C, y a continuación dializado frente a tampón Tris-HCl (pH 7,5) durante 4 h— se añadieron con una jeringa a la mezcla de reacción, y el potencial redox se ajustó al valor deseado con ferricianuro 50 mM. La mezcla de reacción se incubó a 30°C con agitación continua y se sacaron alícuotas de 0,2 ml para ensayar la actividad de la solución en cada momento. Otros detalles se describen en Materiales y Métodos. En la Fig. se representa la actividad, una vez estabilizada, frente al potencial redox correspondiente. La línea continua representa la titulación redox teórica suponiendo  $n=1$ . En el recuadro interno se presentan las cinéticas de reactivación del enzima a diferentes potenciales redox. Similares resultados se obtuvieron cuando el enzima utilizado se inactivó con NADH en aire, y no con ditionito y cianuro.

varse es el mismo, independientemente de que la inactivación se efectúe con ditionito y cianuro o con NADH en aire.

Es importante indicar que las soluciones de enzima inactivado por incubación con ditionito o cianuro o con NADH, y posteriormente dializadas para eliminar el exceso de reactivos, presentan un potencial redox de +200 mV. En estas condiciones el potencial redox es suficientemente positivo como para reactivar el enzima. Sin embargo, la reactivación no tiene lugar a menos que exista ferricianuro en la mezcla de incubación (ver leyenda de la Fig. 40), aunque el potencial sea menor de +200 mV, lo que indica que ninguno de los mediadores redox usados es capaz de acceder al grupo reducido del enzima que hay que oxidar. Es, por tanto, necesaria la presencia de ferricianuro, aunque sea en cantidades catalíticas, para oxidar el sitio de regulación del enzima inactivo.

#### IV. DISCUSSION

Los resultados descritos en este trabajo suponen importantes conocimientos sobre la composición, estructura y mecanismo de acción y regulación, así como otras propiedades físico-químicas del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa del alga verde *Ankistrodesmus braunii*.

En primer lugar, se ha puesto a punto un método de purificación basado fundamentalmente en la cromatografía de afinidad con azul-Sefarosa, que ha permitido obtener preparaciones enzimáticas con una actividad específica de 72-80 U/mg, una recuperación del 30% aproximadamente, y un factor de purificación de una 1.600 veces. Ello ha supuesto una considerable mejora en la calidad de las preparaciones enzimáticas hasta ahora obtenidas, que presentaban actividades específicas de 0,6 U/mg (Ahmed y Spiller, 1976) y 49 U/mg (De la Rosa *et al*, 1980b). El procedimiento de purificación aquí desarrollado se basa esencialmente en el descrito por De la Rosa *et al* (1980b), con algunas modificaciones y un nuevo paso de cromatografía de afinidad.

La relación de absorbancias  $A_{278}/A_{414}$ , que da idea del grado de pureza de las soluciones enzimáticas al relacionar la absorbancia debida a proteína con aquélla debida a la banda Soret del cromóforo hemo de la nitrato reductasa de *A. braunii*, fue 2,56, significativamente inferior a la previamente obtenida para este enzima (3,15) (De la Rosa *et al*,

1980b). La mayor absorbancia de los aminoácidos aromáticos a 280 nm, así como su mayor cromogenicidad al reaccionar con el reactivo fenólico de Folin usado para determinar la concentración de proteína (Peterson, 1979), explicaría la mayor actividad específica (85-100 U/mg) y la menor relación proteína/hemo ( $A_{280}/A_{413} = 1,74$ ) encontradas en la nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* (Giri y Ramadoss, 1979), ya que el enzima de *A. braunii* tiene un mayor contenido en aminoácidos aromáticos que el de *C. vulgaris* (ver apdo. III.D.1.).

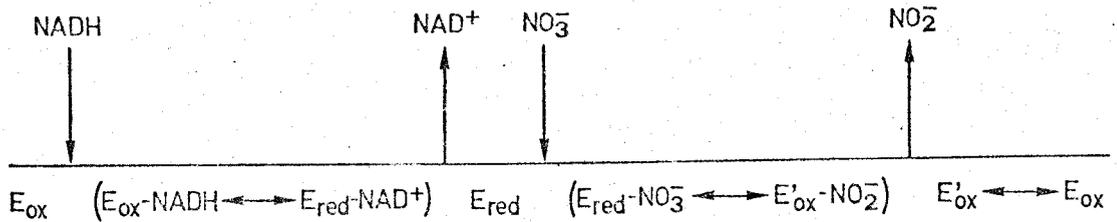
Las preparaciones de nitrato reductasa de *A. braunii* obtenidas por el método aquí descrito eran homogéneas, ya que una sola banda de proteína con actividad MVH-nitrato reductasa se observó en electroforesis analítica (Fig. 8). No obstante, en otras ocasiones aparecieron algunas bandas secundarias correspondientes a proteínas cuyo peso molecular era submúltiplo de aquél del complejo enzimático nativo (Fig. 19). Por otra parte, al someter una solución enzimática a centrifugación en un gradiente de sacarosa, apareció un pequeño pico de actividad NAD(P)H-nitrato reductasa con un coeficiente de sedimentación de 3,9 S (Fig. 17). Finalmente, por microscopía electrónica se pudieron detectar unas moléculas más pequeñas que el enzima nativo, las cuales probablemente correspondían a las subunidades del enzima en

distintos estados de agregación (Fig. 31). Todo esto hace pensar que la nitrato reductasa de *A. braunii* pierde fácilmente su estructura nativa por disociación de sus subunidades. Similar comportamiento se ha observado en otras nitrato reductasas. Así, el enzima de *Aspergillus nidulans* presenta cuatro bandas de proteína al someterlo a electroforesis en geles de poliacrilamida, cuyos pesos moleculares son 360.000; 300.000; 240.000 y 118.000 (Downey y Steiner, 1979). El enzima de cebada se disocia fácilmente dando lugar a fragmentos más pequeños, probablemente subunidades, que poseen actividad NADH-diaforasa (Small y Wray, 1979; 1980). Una posibilidad alternativa sería que los distintos fragmentos obtenidos sean independientes de las subunidades de la nitrato reductasa, y fueran formados como consecuencia de una degradación proteolítica del enzima (Wallace, 1974; 1978). Por ejemplo, la rotura tróptica de la sulfito oxidasa, otra hemomolibdo-proteína, se ha conseguido recientemente (Johnson y Rajagopalan, 1977; Southerland *et al.*, 1978), y fragmentos catalíticamente funcionales se han obtenido del citocromo  $b_2$  de *Sacharomyces cerevisiae* (Jacq y Lederer, 1972) y de la piruvato deshidrogenasa de *Escherichia coli* (Hale y Perham, 1979) por acción de ciertas proteinasas endógenas. Los resultados aquí presentados no nos permiten distinguir entre estas dos posibilidades, aunque el hecho de que la nitrato reductasa de *A. braunii* siempre dé una sola banda de proteína en electroforesis con SDS hace pensar que se trata de las subunidades del enzima.

Las representaciones de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales de la reacción de oxidación del NADH por la nitrato reductasa a concentraciones variables de los sustratos, dió lugar a una serie de líneas paralelas (Figs. 11 y 12). Estos resultados son compatibles con un mecanismo catalítico del tipo ping pong, en el que el primer sustrato —probablemente el NADH— convierte al enzima en una forma reducida la cual a continuación interacciona con el segundo sustrato —el nitrato— dando lugar al producto final y al enzima original. Resultados similares se han obtenido con el enzima de espinaca (Eaglesham y Hewitt, 1971; 1975; De la Rosa, 1975), calabaza y maiz (Campbell y Smarelli, 1978), pero bastante diferentes a los encontrados con el enzima de *Aspergillus nidulans* (McDonald y Coddington, 1974). Este mecanismo cinético se ve apoyado por el hecho de que la nitrato reductasa de *A. braunii* es reducible por el NADH en ausencia de nitrato y con la falta de cambios espectrales observados al añadir nitrato en ausencia de NADH (Diez, 1978).

El nitrito, producto de la reacción catalizada por la nitrato reductasa, inhibe dicha reacción. La inhibición fué de tipo no competitivo respecto al NADH,  $K_i = 6,4$  mM, lo que indica que el nitrito probablemente se une a una forma oxidada del enzima diferente de la nativa, a la que se une el NADH. De acuerdo con estos datos, se puede proponer un mecanismo de tipo iso ping pong bi bi, en el que la forma oxidada resultan

te del ciclo catalítico,  $E'_{ox}$ , debe de sufrir una isomerización posterior para originar la especie nativa,  $E_{ox}$ :



Campbell y Smarelli (1978) encontraron un sistema de líneas paralelas en la representación de recíprocos de las velocidades iniciales de la nitrato reductasa de calabaza y maíz, pero los estudios de inhibición por productos no correspondían a una cinética estándar del tipo ping pong, por lo que propusieron un mecanismo híbrido entre ping pong y al azar. Por otra parte, Hewitt *et al* (1979) han descrito un posible mecanismo de acción de la nitrato reductasa de eucariotas en el cual el NADH y el nitrato se unen al enzima de una forma aleatoria, y en el que el nitrito es desplazado por el nitrato al final del ciclo catalítico para rendir la forma original.

La nitrato reductasa de *A. braunii* resulta ser un enzima muy peculiar, en términos de composición y estructura, si se compara con el enzima de otros organismos eucarióticos (Tabla XV). Así, mientras que la nitrato reductasa presenta normalmente un peso molecular comprendido entre 197.000 y 280.000 y el número de sus subunidades oscila entre 2 y 4, el enzima de *A. braunii* tiene un peso molecular de 467.400 y está compues-

TABLA XV

## PROPIEDADES DE LAS NITRATO REDUCTASAS ASIMILATORIAS ALTAMENTE PURIFICADAS

	<i>Anacystis nidulans</i>	<i>Ankistrodesmus braunii</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Spinacea oleracea</i>	<i>Neurospora crassa</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
Peso molecular (kdaltons)	75	467	280	197	228	230
Subunidades	1	8	3	4	2	2
S <sub>20,w</sub> (S)	5,4	10,9	10,0	8,1	8,0	7,9
Radio de Stokes (nm)	3,2	9,8	6,3	6,0	7,0	7,0
Donador de electrones	Fd	NAD(P)H	NADH	NADH	NAD(P)H	NAD(P)H
Activ. espec. (U/mg)	875 <sup>a</sup>	80	95	24	125 <sup>b</sup>	148 <sup>b</sup>
Número de recambio (s <sup>-1</sup> )	1094 <sup>a</sup>	623	434	79	475 <sup>b</sup>	567 <sup>b</sup>
pH óptimo	10,5 <sup>a</sup>	7,5	7,6	7,5	7,5	7,5
K <sub>m</sub> NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (μM)	690	150	84	180	200 <sup>b</sup>	125 <sup>b</sup>
K <sub>m</sub> donador (μM)	13	13	nd	4,6	62 <sup>b</sup>	20 <sup>b</sup>
Grupos prostéticos:						
FAD	-	3,5	2,6	nd*	nd*	nd*
cit b <sub>557</sub>	-	3,8	2,5	nd*	1,5	1
Mo	nd*	1,6	2,0	nd*	0,9	nd*
E <sub>h</sub> , pH 7, hemo (mV)	-	-73, n=1	nd	-60, n=1	nd	nd
Propiedades espectrales:						
Máximos de absorción (ox)	273	278,414,532,562,669	279,413	280,413	280,413	278,412
(red)	-	424,528,557,669	423,527,557	424,527,557	423,528,557	423,527,557
A <sub>280</sub> /A <sub>Soret</sub>	-	2,5	1,7	4,6	nd	nd
ε (Soret) (mM <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	-	460	280	nd	nd	124
Referencias <sup>c</sup>	1,2	3,4,5	6,7,8	9,10	11,12	13

nd = no determinado

nd\* = presente, pero no determinado cuantitativamente

a = metil viológeno reducido con ditionito como reductor

b = NADPH como reductor

c = ver la lista de referencias en la página siguiente

Lista de referencias que aparecen en la Tabla XV:

1. Candau, 1979
2. Manzano *et al*, 1976
3. Ahmed y Spiller, 1976
4. De la Rosa *et al*, 1980b
5. Este trabajo
6. Giri y Ramadoss, 1979
7. Solomonson, 1979
8. Solomonson *et al*, 1975
9. Hewitt y Notton, 1980
10. Notton y Hewitt, 1979
11. Garrett y Amy, 1978
12. Pan y Nason, 1978
13. Guerrero y Gutiérrez, 1977

to por 8 subunidades de 58.750. Por otra parte, el coeficiente de sedimentación, 10,9 S, y el radio de Stokes, 9,8 nm, del enzima de *A. braunii* también son bastante superiores a los de otras nitrato reductasas (Tabla XV).

Respecto al número de recambio (*turnover number*) del enzima para la actividad NAD(P)H-nitrato reductasa, todos tienen valores comprendidos entre 434 y 623 s<sup>-1</sup>, a excepción del enzima de espinaca que es de 79 s<sup>-1</sup>. El enzima de *Anacystis nidulans* presenta un número de recambio de 1.094 s<sup>-1</sup> cuando se usa metil viológeno reducido con ditionito como donador de electrones. Estos valores, notablemente superiores a los de otros enzimas, demuestran la tremenda eficiencia catalítica de la nitrato reductasa en la reducción de nitrato, a la vez que explica los bajos niveles intracelulares de este enzima. Teniendo en cuenta los datos de la Tabla I, solamente 17-18 mg de nitrato reductasa se podrían obtener, considerando un rendimiento del 100%, a partir de 1 Kg (peso fresco) de células de *A. braunii*. Este es, por tanto, un problema fundamental que se ha de afrontar a la hora de llevar a cabo una caracterización física directa de estos enzimas.

Los estudios espectrofotométricos y espectrofotofluorimétricos realizados con la nitrato reductasa de *A. braunii* demuestran la presencia de flavina y hemo como grupos prostéticos del enzima. Kinsky y McElroy (1958) fueron los primeros

en observar que el FAD estimulaba la reducción de nitrato por NAD(P)H catalizada por la nitrato reductasa de *Neurospora crassa*. Un efecto similar fué observado cuando el enzima de *Chlorella fusca* (Zumft *et al*, 1970) y de espinaca (Relimpio *et al*, 1971) se purificaba por filtración en gel. Estos autores demostraron además que el FAD protegía específicamente a la nitrato reductasa frente a la inactivación térmica. Por otra parte, la adición de FAD a una preparación de nitrato reductasa de hojas de maiz no estimulaba la actividad del enzima, si bien el FAD servía como eficaz protector frente a la inactivación térmica del mismo (Roustan *et al*, 1974).

Aunque el tipo de flavina en la nitrato reductasa de *A. braunii* no se ha analizado, el FAD parece ser el componente flavínico de este enzima, ya que protege específicamente su actividad durante la purificación y, por otra parte, se requiere en el tampón para la elución del enzima retenido en la columna de azul-Sefarosa (De la Rosa *et al*, 1980a). El FAD se ha identificado inequívocamente por análisis directo como componente de la nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* (Solomonson *et al*, 1975) y *Neurospora crassa* (Jacob y Orme-Johnson, 1980).

Las propiedades espectrales de la nitrato reductasa de *A. braunii* indican claramente la presencia en la preparación enzimática de un grupo hemo derivado de protoporfirina IX, el cual se ha identificado como tipo *b* por estudios espectrofo-

tométricos de su derivado hemocromógeno reducido en piridina (Fig. 27). Desde que Garrett y Nason (1969) sugirieron la existencia de citocromo  $b_{557}$  en la nitrato reductasa de *Neurospora crassa*, este grupo prostético se ha encontrado en todas las nitrato reductasas de eucariotas estudiadas hasta ahora, pero no en el enzima de procariotas (Tabla XV). El citocromo  $b_{557}$  presenta máximos de absorbancia a 557 ( $\alpha$ ), 527-528 ( $\beta$ ) y 423-424 (Soret) nm en su forma reducida, mientras que sólo un máximo a 412-414 nm se encuentra en la forma oxidada. En el enzima de *A. braunii*, sin embargo, usando concentraciones superiores de proteína se han podido detectar nuevos máximos de absorción a 532 ( $\beta$ ) y 562 ( $\alpha$ ) nm en la forma oxidada del hemo, así como otro máximo a 669 nm que no se modifica por óxido-reducción.

El máximo de absorbancia a 669 nm puede ser debido a las interacciones del grupo hemo con la proteína. El citocromo *c* presenta un máximo a 695 nm que se debe al enlace entre el cromóforo hemo y un residuo de metionina de la proteína (Gall *et al*, 1971; Greenwood y Wilson, 1971). La absorbancia a 695 nm es independiente de los cambios redox ocurridos en el hemo, pero es modificada levemente por ligeros cambios conformacionales y desaparece totalmente cuando se rompe el enlace hemo-proteína (Greenwood y Wilson, 1971). Por el contrario, el citocromo P-450 presenta un máximo de absorción a 646 nm que desaparece por reducción (Griffin y Peterson, 1971).

Los espectros de resonancia paramagnética del electrón (EPR) de la nitrato reductasa de *A. braunii* con señales de resonancia a valores de  $g$  iguales a 2,26; 2,79 y 3,08 confirman la existencia de hemo en la preparación, con el hierro férrico en el estado de bajo *spin*. Hierro hemínico de bajo *spin* acompañado a dos residuos de imidazol, típico de los citocromos tipo *b*, se ha detectado en la nitrato reductasa de *Neurospora crassa*, con señales de resonancia a  $g = 2,27$  y  $2,98$  (Jacob y Orme-Johnson, 1980).

El análisis cuantitativo de los distintos componentes prostéticos de la nitrato reductasa de *A. braunii* indican que dicho enzima contiene 4 moléculas de FAD, 4 hemos y dos átomos de molibdeno por cada molécula de ocho subunidades. Estos tres componentes se han encontrado en todas las nitrato reductasas, a excepción de las de procariotas que sólo tienen molibdeno (Tabla XV). Sulfuro lábil e hierro no hemínico no se han detectado en el enzima de *A. braunii*, como tampoco en el de *Chlorella vulgaris* (Solomonson *et al*, 1975). Downey y Steiner (1979), sin embargo, han encontrado hierro no hemínico en la nitrato reductasa de *Aspergillus nidulans* aunque sin demostrar que este tipo de hierro es funcional en la reducción de nitrato.

El molibdeno se ha identificado inequívocamente como

componente prostético de todas las nitrato reductasas estudiadas hasta ahora (Hewitt y Notton, 1980; Losada *et al*, 1981), y se cree que probablemente se encuentre en el sitio del enzima donde el nitrato se une y se reduce (Hewitt *et al*, 1979).

Evidencias experimentales obtenidas principalmente con el enzima de hongos sugieren que el molibdeno en la nitrato reductasa existe formando parte de un cofactor polipeptídico de bajo peso molecular, que parece ser común a todas las molibdo-proteínas, a excepción de la nitrogenasa (Johnson, 1980). Se ha propuesto recientemente que el cofactor activo está compuesto de molibdeno y una forma reducida de una nueva pterina (Johnson *et al*, 1980).

Un estudio comparativo de la composición de grupos prostéticos en las nitrato reductasas purificadas hasta la fecha se recoge en la Tabla XV. La relación hemo/molibdeno es 2/1 en la nitrato reductasa de *A. braunii*, mientras que la relación hallada en otras nitrato reductasas es: 1/1 (Solomonson *et al*, 1975) o 3/2 (Giri y Ramadoss, 1979) en *C. vulgaris*, 2/1 (Pan y Nason, 1978) o 1/1 (Jacob y Orme-Johnson, 1980)

en *N. crassa* y 2/1 (Notton y Hewitt, 1979) en espinaca. Por otra parte, el contenido hemínico es generalmente inferior al número de subunidades. Los datos, en número de grupos hemo por subunidades, son: 4/8 en *A. braunii*, 2/3 (Solomonson *et al*, 1975) o 3/3 (Giri y Ramadoss, 1979) en *C. vulgaris*, 2/2 (Pan y Nason, 1978) o 1/2 (Jacob y Orme-Johnson, 1980) en *N. crassa*, 1/2 (Guerrero y Gutiérrez, 1977) en *R. glutinis* y 2/4 (Notton y Hewitt, 1979) en espinaca. Estas observaciones indican que las nitrato reductasas deben estar compuestas por subunidades diferentes, aunque ello no ha podido demostrarse en ningún caso por electroforesis con SDS. Wray *et al* (1979) han llegado a sugerir hasta cuatro tipos de subunidades en el enzima de plantas superiores. Fernández y Cárdenas (1980), por estudios de complementación *in vitro* con mutantes de *Chlamydomonas reinhardii*, han propuesto la existencia de, al menos, dos tipos de subunidades: una, responsable de la actividad diaforasa, y la otra, correspondiente a la mitad terminal.

Los estudios sobre el ensamblaje tridimensional de las ocho subunidades del complejo enzimático nitrato reductasa de *A. braunii*, se llevaron a cabo por microscopía electrónica. La molécula enzimática apareció como una estructura abierta en forma de anillo, donde las ocho subunidades se disponen ocupando dos planos alternativamente. El procesamiento de una de las imágenes por superposición óptica reveló que la molé-

cula posee una simetría rotacional de ocho veces. La nitrato reductasa de *C. vulgaris*, también observada al microscopio electrónico por Giri y Ramadoss (1979), es una molécula aproximadamente globular, compuesta por tres subunidades asimétricas que se ensamblan formando un triángulo equilátero.

Debido a la importancia fundamental que la asimilación del nitrógeno inorgánico tiene para el desarrollo de cualquier organismo, sería de esperar una alta estabilidad evolutiva en las propiedades básicas de los enzimas involucrados en este proceso. Por ejemplo, todas las nitrogenasas de los organismos diazotrópicos tienen idéntica estructura (Zumft, 1976) y parecida composición de aminoácidos (Eady y Smith, 1979), independientemente de que procedan de organismos fototróficos o heterotróficos, aeróbicos o anaeróbicos, de cianobacterias o bacterias simbióticas. La glutamina sintetasa, primer enzima de la ruta de asimilación del amonio, presenta una estructura dodecamérica en procariotas y octamérica en eucariotas (Prusiner y Stadtman, 1973). A pesar de esta diferencia estructural, su composición de aminoácidos, comparada por métodos estadísticos, hace pensar que un gran número de secuencias homólogas existe en la glutamina sintetasa de procariotas y eucariotas (Kleinschmidt y Kleiner, 1979; Alef *et al*, 1980).

Es difícil, por tanto, reconciliar la estructura de la nitrato reductasa de *Ankistrodesmus braunii* con la de *Chlorella vulgaris*, respecto al número y tamaño de sus cadenas poli

Peptídicas y al número de grupos prostéticos, así como respecto a la estructura tridimensional de la molécula. Teniendo en cuenta además la estrecha relación taxonómica de estas dos algas verdes (Fott, 1971), se habría esperado una estructura similar para los dos enzimas. Aunque ambas nitrato reductasas contienen dos átomos de molibdeno, un hecho sin explicación aparente que es común entre las molibdo proteínas (Bray y Swann, 1972), el enzima de *A. braunii* contiene el doble de flavinas y hemos por átomo de molibdeno que el de *C. vulgaris*. Cuatro cadenas polipeptídicas por molibdeno se encuentran en el enzima de *A. braunii*, mientras que en el de *C. vulgaris* no hay relación coherente (Solomonson *et al*, 1975; Giri y Ramadoss, 1979). Dentro de este contexto, el enzima de *C. vulgaris* se clasifica en el raro grupo de proteínas que tienen una estructura trimérica (Klotz *et al*, 1973).

La inhibición por pHMB de la primera mitad, *i. e.* NAD(P)H-diaforasa, del complejo enzimático nitrato reductasa de *A. braunii*, se protege específicamente por NADH, indicando no sólo la existencia de grupos sulfhidrilos esenciales para la actividad enzimática, sino su participación en la unión del piridín nucleótido reducido al enzima. Resultados semejantes se han encontrado en otras nitrato reductasas (Relimpio *et al*, 1971; Vega *et al*, 1972). Estudios recientes en la nitrato reductasa de *Neurospora crassa* confirman la interpretación anterior y sugieren la participación activa de los grupos -SH en el flujo de electrones desde el NAD(P)H hasta el grupo pros-

tético flavínico (Amy *et al*, 1977).

Los efectos de estimulación por FAD de la actividad NAD(P)H-nitrato reductasa, así como la protección que ejerce la flavina frente a la pérdida de la actividad enzimática durante la purificación o desnaturalización térmica, que se ha discutido anteriormente, permitieron asignar al FAD un papel funcional, y se localizó en la actividad diaforasa del complejo nitrato reductasa (Garrett y Amy, 1978; Guerrero *et al*, 1981). Estas observaciones se han confirmado en este trabajo para la nitrato reductasa de *A. braunii*, y se ha visto además que el FAD se disocia fácilmente de la proteína a la vez que ocurre una pérdida paralela de la actividad NAD(P)H-nitrato reductasa.

Es importante resaltar aquí que la reducción del cromóforo hemínico de la nitrato reductasa de *A. braunii* por NAD(P)H requiere que los grupos sulfhidrilos del enzima estén intactos y que el FAD permanezca unido al mismo (Figs. 28 y 29), lo que indica que los grupos -SH y el FAD preceden al citocromo en la cadena transportadora de electrones del enzima.

La reducción del citocromo de la nitrato reductasa de *A. braunii* por NAD(P)H y su posterior reoxidación por un exceso de nitrato, sugieren la idea de una participación activa del cromóforo hemo en la cadena de transporte de electrones del

enzima. Resultados semejantes se han establecido en la nitrato reductasa de *Neurospora crassa* (Garrett y Nason, 1967), *Chlorella vulgaris* (Solomonson *et al*, 1975) y espinaca (Notton y Hewitt, 1979). No obstante, la localización del hemo en la cadena de transporte y en la molécula de enzima permanece sin aclarar. Así, Fido *et al* (1979) han sugerido que el grupo prostético hemínico del enzima de espinaca podría ser esencial para la funcionalidad de la actividad diaforasa, mientras que el hecho de que el citocromo  $b_{557}$  de la nitrato reductasa de *A. braunii* sea reducible por el FMN fotorreducido por EDTA y reoxidable por nitrato (Fig. 27) indicaría una participación del hemo en la actividad terminal del enzima. Por tanto, es posible pensar que el hemo actúe como nexo de unión entre las dos mitades del complejo, *i. e.* mediando la transferencia de electrones desde la diaforasa a la terminal.

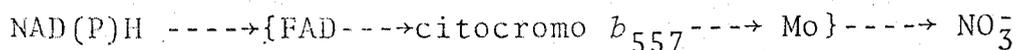
La esencialidad del molibdeno para la actividad nitrato reductasa se descubrió hace bastante tiempo: experimentos a niveles celular y enzimático demostraron el papel clave de este metal en la nitrato reductasa y su participación en la mitad terminal del complejo enzimático (Vega *et al*, 1971). Sin embargo, no hay acuerdo acerca de los cambios redox que sufre el molibdeno durante la reducción catalítica del nitrato a nitrito, aunque todas las molibdoenzimas, a excepción de la nitrogenasa, en su estado nativo tienen Mo(VI) (Bray, 1975). Basados fundamentalmente en estudios realizados con modelos

químicos, se ha propuesto que el estado de oxidación del molibdeno cambia de Mo(IV) a Mo(VI) (Stiefel, 1973), de Mo(III) a Mo(V) (Ketchum *et al*, 1976) e incluso de Mo(V) a Mo(VI) (Garner *et al*, 1974).

Los estudios espectroscópicos por EPR de la nitrato reductasa de *A. braunii* realizados para intentar detectar alguna señal de resonancia en la región cercana a  $g = 2$ , atribuible al molibdeno, fueron infructuosos. Esto era de esperar puesto que la especie Mo(VI), típica de las molibdoenzimas en su estado nativo, es diamagnética. Asimismo, la reducción con ditionito de la nitrato reductasa de *A. braunii* no originó ninguna nueva señal de resonancia, lo que indicaría que el molibdeno se encuentra en su estado de valencia IV o algún otro también diamagnético. Similares resultados han encontrado Jacob y Orme-Johnson (1980) con el enzima de *Neurospora crassa*, pero consiguieron detectar una señal a  $g = 1,97$ , probablemente debida a Mo(V) (paramagnético), al realizar una titulación reductiva con NADH. Ellos sugieren la existencia de Mo(VI) en la preparación enzimática nativa, el cual pasa a Mo(V) durante la titulación, y finalmente pasa a Mo(IV) cuando el reductor está en exceso.

A la luz de los resultados aquí expuestos, la ruta que siguen los electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato, a través de la nitrato reductasa de organismos eucarióticos,

puede esquematizarse de la siguiente forma:



Por otra parte, se ha intentado confirmar esta secuencia desde un punto de vista potenciométrico. Así, el potencial normal del citocromo  $b_{557}$  de la nitrato reductasa de *A. braunii*, a pH 7,0, fué de -73 mV, muy próximo al del citocromo del enzima de espinaca, -60 mV, calculado por Fido *et al* (1979). El potencial redox de la flavina del enzima de *A. braunii* se intentó determinar de una forma similar a la utilizada para medir el potencial del hemo, pero debido a la gran absorción de la banda Soret del citocromo en la zona de absorbancia de la flavina y a la rápida disociación de la flavina unida a la proteína, los intentos realizados fueron infructuosos. De cualquier forma, se puede decir que desde un punto de vista potenciométrico el citocromo  $b_{557}$  está situado detrás del FAD ( $E^{\circ}$ ,  $\text{FADH}_2/\text{FAD}$ , a pH 7, = -220 mV) en la cadena de transporte de electrones desde el NAD(P)H ( $E^{\circ}$ ,  $\text{NAD(P)H}/\text{NAD(P)}^+$ , a pH 7, = -320 mV) hasta el nitrato ( $E^{\circ}$ ,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , a pH 7, = +420 mV). No obstante, hay que indicar que el potencial redox de la flavina unida a la proteína puede ser bastante diferente al de la flavina libre, dependiendo de la naturaleza de las interacciones entre el enzima y los grupos prostéticos, según se ha comprobado en otras flavoproteínas (Mayhew y Ludwig, 1975).

En base a la composición y estructura de la nitrato reductasa de *A. braunii* y teniendo en cuenta la secuencia de electrones aquí expuesta, se propone el modelo que aparece en la Fig. 41 para la distribución de los grupos prostéticos entre las subunidades y el transporte electrónico.

La regulación de la reducción asimilatoria de nitrato es un proceso complejo, y es difícil reconciliar en un mismo mecanismo de control todas las observaciones encontradas hasta la fecha. Así, la idea actualmente aceptada es que la asimilación de nitrato es susceptible de control a varios niveles.

En este trabajo se ha tratado de profundizar en el mecanismo de inactivación de la nitrato reductasa, haciendo estudios de interconversión *in vitro* con preparaciones puras de nitrato reductasa, donde la interpretación de los resultados puede ser muy concreta.

En primer lugar, se ha visto que el oxígeno se requiere para llevar a cabo la inactivación con NADH de la nitrato reductasa de *A. braunii*, siendo la velocidad de este proceso dependiente de la presión parcial de oxígeno. Similar requerimiento de oxígeno se ha encontrado para inactivar *in vitro* la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* (Chaparro *et al*, 1979) y otros enzimas como la nitrito reductasa (Vega *et al*, 1975b), xantina deshidrogenasa (Betcher-Lange *et al*, 1979) y sulfito reductasa (Cohen y Fridovich, 1971). Es importante

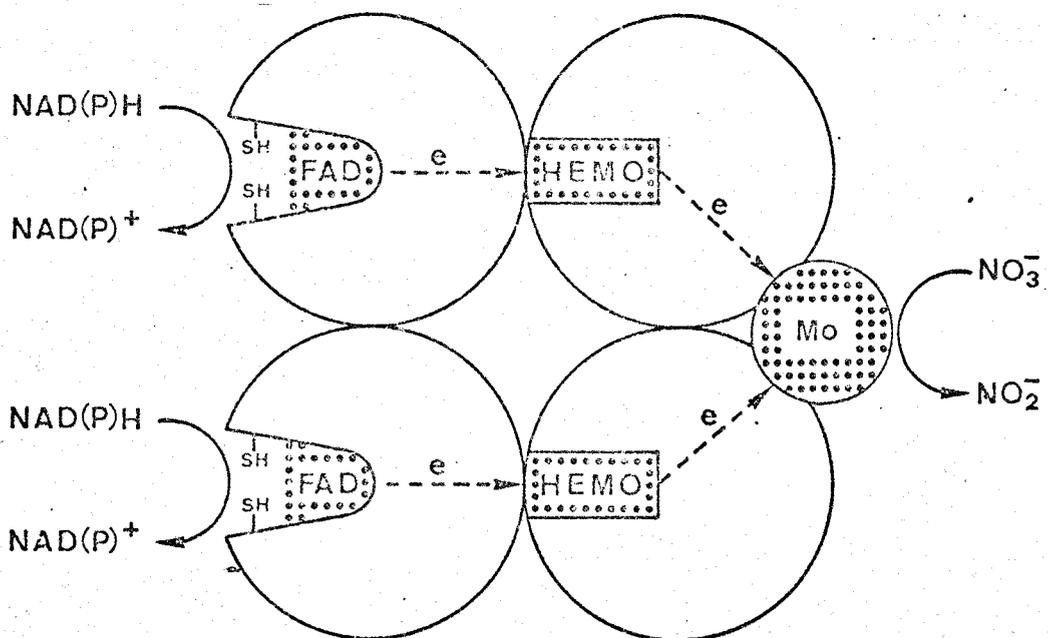


Figura 41. Modelo tentativo de la distribución de los grupos prostéticos y secuencia del transporte electrónico en la nitrato reductasa de *A. braunii*. El esquema corresponde a las cuatro subunidades de uno de los planos, mientras que las otras cuatro ocuparían otro plano girado 45° respecto a éste (ver Fig. 34).

resaltar que todos ellos son flavoproteínas, donde el enzima reducido puede interaccionar con el oxígeno y producir  $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^*$ , etc.

En el caso de la nitrato reductasa de *A. braunii* se ha identificado como especie inactivante *in vitro* el radical superóxido ( $O_2^-$ ), cuya formación en la mezcla de incubación requiere FAD y la primera actividad del complejo enzimático plenamente funcional. Estos resultados suponen una evidente contradicción con aquellos otros encontrados en la nitrato reductasa de *Neurospora crassa* (Vega *et al*, 1975b) y en la xantina deshidrogenasa, otra molibdo proteína, de hígado de pollo (Betcher-Lange *et al*, 1979), en las que la inactivación parece ser que tiene lugar por el agua oxigenada, generada durante la reacción catalítica del enzima con el oxígeno.

El efecto del oxígeno sobre la inactivación *in vivo* de la nitrato reductasa en algas verdes es más bien controvertido. Interrumpiendo la aireación de un cultivo de células de *Chlamydomonas reinhardtii*, la nitrato reductasa llegó a inactivarse completamente en menos de 15 min, probablemente debido a que la baja tensión de oxígeno producía un aumento en el nivel intracelular de poder reductor (Losada, 1974). En *A. braunii* la anaerobiosis del cultivo tenía un efecto mucho menor sobre el nivel de actividad nitrato reductasa, comparado con *C. reinhardtii*, bajo idénticas condiciones (Diez *et al*, 1977). Por el contrario, Pistorius *et al* (1976) explican el

requerimiento de oxígeno para la inactivación *in vivo* de la nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* como un resultado de la estimulación por oxígeno de la formación de cianuro, el cual ellos proponen, junto con el NADH, como agente necesario para inactivar el enzima. Estas contradicciones pueden deberse a que muchas y muy variadas modificaciones tienen lugar en las células cuando éstas se someten a bajas tensiones de oxígeno, lo que puede afectar de forma diferente, dependiendo del organismo, a la actividad nitrato reductasa. Sin embargo, parece estar fuera de dudas que el oxígeno tiene un importante papel en el mecanismo de inactivación de la nitrato reductasa.

Es importante señalar aquí el papel del nitrato, aceptor fisiológico de electrones de la nitrato reductasa, y del cianato, inhibidor competitivo respecto al nitrato, en la inactivación del enzima. Ambos compuestos protegen al enzima frente a su inactivación con NADH, lo cual es indicativo de que la modificación que sufre la nitrato reductasa y que conduce a su inactivación, puede ocurrir en un grupo muy cercano si no en el mismo sitio activo donde se une el nitrato,

Los datos recogidos en la Fig. 38 indican que la nitrato reductasa de *A. braunii* se inactiva por una modificación permanente que conduce a un bloqueo en la cadena transportadora de electrones del enzima, y localizado en un punto posterior al citocromo  $b_{557}$ , probablemente el molibdeno.

Por otra parte, la nitrato reductasa de *A. braunii* se inactiva muy rápidamente por incubación con ditionito y cianuro, hecho que parece ser común a todas las nitrato reductasas (Vega *et al*, 1972; Solomonson, 1974; Lorimer *et al*, 1974; Barea *et al*, 1976b), aunque los datos obtenidos en este trabajo ponen en duda la significación fisiológica del cianuro.

Para precisar la modificación que ocurre en la proteína, así como los grupos involucrados en la inactivación de la nitrato reductasa de *A. braunii*, se llevó a cabo una titulación redox de este proceso utilizando ditionito y cianuro como sistema inactivante y no NADH por las siguientes razones: 1) el piridín nucleótido introduce los electrones en el enzima al comienzo de la cadena transportadora de electrones (-SH o FAD) pudiendo interferir los potenciales redox de estos grupos, ya que se medirían éstos y no el del grupo donde radica la inactivación, localizado al final de la cadena transportadora; 2) el FAD, componente prostético del enzima anterior al hemo y al molibdeno, se disocia fácilmente de la proteína y es aceptor de electrones de la mitad diaforasa y donador de la terminal, pudiendo por tanto 'circuitar' el transporte electrónico e introducir electrones en el enzima a un nivel distinto que el piridín nucleótido; 3) el ditionito permite alcanzar un determinado potencial redox, a la vez que mantener un equilibrio con los mediadores redox utilizados en la titulación, con más facilidad que el NADH. Los resultados obtenidos indican que la inactivación con ditionito y cianuro de

la nitrato reductasa de *A. braunii* es un proceso redox que implica la transferencia de un solo electrón con un potencial normal de -50 mV, a pH 7,5.

La reactivación *in vivo* de la nitrato reductasa de algas verdes se consigue completamente, en 1-2 h, al eliminar del medio de cultivo el agente inactivante (Losada *et al*, 1970; Losada *et al*, 1973). Sin embargo, poco se sabe acerca del mecanismo de dicha activación. Estudios *in vitro* han demostrado que la nitrato reductasa inactivada en condiciones fisiológicas se reactiva rápidamente por oxidación con ferricianuro (Jetschmann *et al*, 1972; Herrera *et al*, 1972). Por otra parte, el ferricianuro es muy eficaz como agente reactivador de la nitrato reductasa previamente inactivada por incubación con NADH solo (Moreno *et al*, 1972; Herrera *et al*, 1972), NADH y ADP (Maldonado *et al*, 1973) o NADH (o ditionito) y cianuro (Vega *et al*, 1972; Garrett y Greenbaum, 1973; Solomonson, 1974), siendo su efecto prácticamente instantáneo. La presencia de nitrato en la mezcla de incubación con el enzima inactivo permite una recuperación significativa de la actividad nitrato reductasa, en un proceso dependiente del tiempo (Moreno *et al*, 1972; Herrera *et al*, 1972).

Por otra parte, el citocromo *c*, aceptor de un solo electrón de la mitad diaforasa del enzima, es prácticamente inerte como agente reactivante, igual que el DCPIP. El ferricia-

nuro ( $E'_0 = + 410 \text{ mV}$ ) es considerablemente más electropositivo que los otros dos ( $E'_0 = +260 \text{ mV}$ ) y esta diferencia podría ser importante. Además, el citocromo *c* debe tener estéricamente difícil acceso al sitio de regulación del enzima, siendo prácticamente imposible una interacción directa metal-metal. Por otra parte, el DCPIP es un aceptor que probablemente necesite protonación simultánea.

La reactivación del enzima inactivo también puede ser llevada a cabo por ciertos complejos trivalentes de manganeso, tales como el pirofosfato mangánico (Funckhouser y Ackerman, 1976), o también por complejos de Mn(III) producidos por cloroplastos iluminados o por sistemas de peroxidasa (Maldonado *et al*, 1980). El hecho de que el Mn(III) y el ferricianuro, agentes oxidantes que intercambian un solo electrón, se comporten con igual eficiencia como reactivantes de la nitrato reductasa puede ser bastante significativo.

El efecto del nitrato como posible oxidante-reactivador de la nitrato reductasa de *A. braunii* previamente inactivada por NADH se ha estudiado en este trabajo. Los resultados obtenidos indican que el nitrato puede ser un buen candidato como sustituto fisiológico del ferricianuro y del Mn(III), ya que el enzima recupera su actividad original cuando éste se incubaba con nitrato. Es importante señalar que las condiciones anaeróbicas mejoran sensiblemente la reactivación por nitrato del enzima inactivo, aunque no llegue a ser tan eficiente como el

ferricianuro. Por otra parte, la luz azul se ha demostrado que tiene un importante efecto sobre la reactivación de la nitrato reductasa (Aparicio *et al*, 1976). Todo ello sugiere que además del nitrato puede haber otros factores involucrados en la reactivación *in vivo* de la nitrato reductasa. De cualquier forma, el nitrato parece jugar un importante papel fisiológico ya sea estabilizando la nitrato reductasa e impidiendo su inactivación o ya reactivando el enzima una vez que la inactivación ha ocurrido.

Para tratar de averiguar la modificación que ocurre y los grupos involucrados durante la interconversión de la nitrato reductasa de *A. braunii*, se realizó una titulación redox del proceso de reactivación con ferricianuro. Los resultados obtenidos permiten concluir que la reactivación del enzima inactivo es un proceso que depende del potencial redox de la solución según una curva de tipo sigmoidal, lo que indica claramente que se trata de un proceso de óxido-reducción. La reactivación, por tanto, supone la oxidación de algún grupo del enzima que requiere un solo electrón y cuyo potencial normal es +230 mV. Idénticos resultados se obtuvieron independientemente de que el enzima hubiera sido inactivado con NADH en aire o con ditionito y cianuro. Así pues, la modificación que tiene lugar en la nitrato reductasa cuando ésta se inactiva con NADH y  $O_2^-$  o con NADH (o ditionito) y  $CN^-$  es idéntica, si no similar, e implica probablemente la reducción por NADH o ditionito de algún grupo funcional del enzima. La función

del radical superóxido, en un caso, y del cianuro, en otro, sería simplemente interaccionar con el grupo ya reducido y formar un complejo estable e inactivo. No obstante, cuál de los dos agentes, si el superóxido o el cianuro, es el reactivo estabilizante del enzima reducido *in vivo* permanece sin aclarar.

El hecho de que ambas titulaciones, reductiva y oxidativa, requieran la transferencia de un solo electrón indica que la especie inactiva de la nitrato reductasa no se trata de una forma 'sobrerreducida' del enzima, como hasta ahora se había propuesto (Chaparro *et al*, 1979; Coughlan *et al*, 1980). Por otra parte, al tratarse del intercambio de un electrón, la inactivación de la nitrato reductasa no puede ocurrir por rotura de algún(os) puente(s) disulfuro (-S-S-) de la proteína ya que este proceso requeriría un mínimo de dos electrones (Palacián *et al*, 1974; Moreno y Palacián, 1974). Así pues, considerando que el grupo responsable de la interconversión de la nitrato reductasa se encuentra al final de la cadena de transporte, que ya anteriormente por otros autores se había sugerido el molibdeno como el punto de regulación, que dicho grupo acepta un solo electrón al inactivarse, que la inactivación requiere superóxido o cianuro como agentes estabilizantes de la forma reducida del enzima y que el molibdeno en el enzima nativo se encuentra en el estado de valencia VI, se propone el esquema que aparece en la Fig. 42 para explicar el mecanismo de interconversión redox de la nitrato reductasa de *A. braunii*.

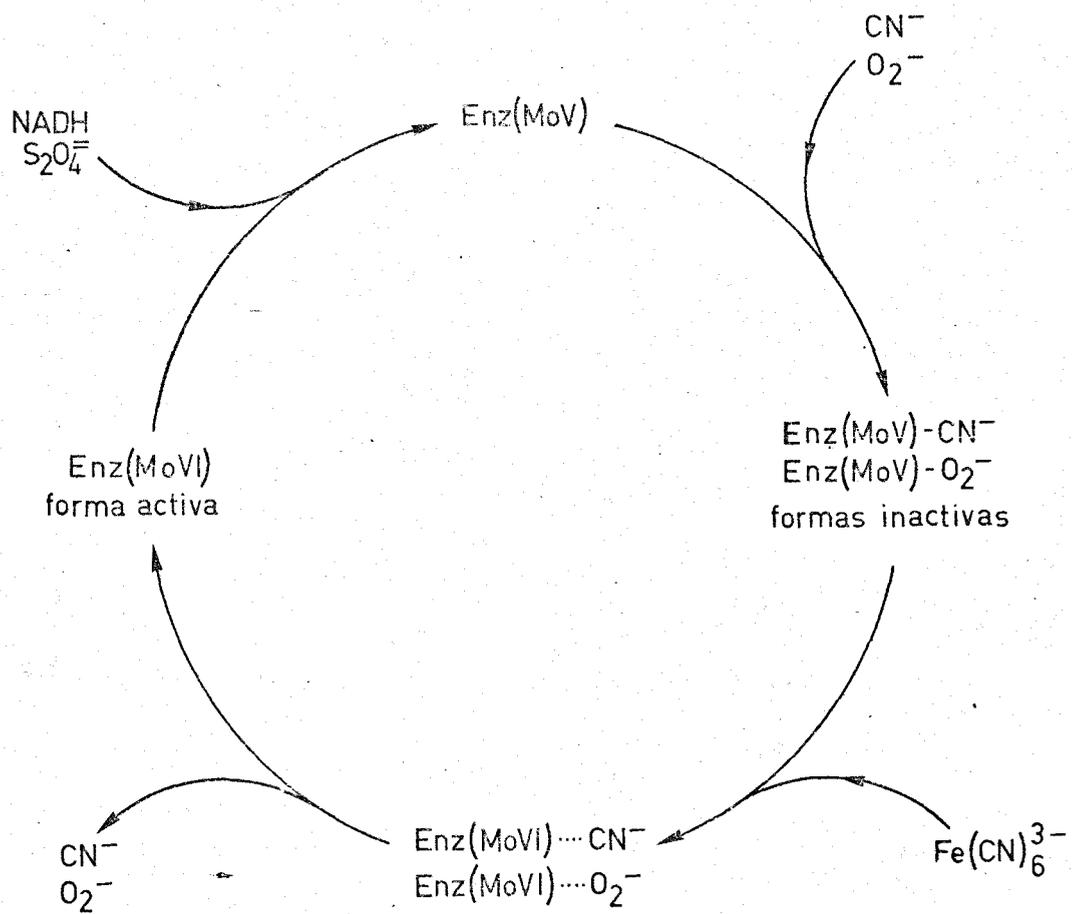


Figura 42. Mecanismo de la interconversión redox de la nitrato reductasa de *A. braunii*.

Ya anteriormente se había propuesto que en el molibdeno radicaba la regulación del enzima nitrato reductasa. De hecho, la inactivación con NADH y cianuro propuesta por el grupo de Vennesland supone que el cianuro se une al molibdeno del enzima previamente reducido por el NADH. Así, Solomonson *et al* (1975) determinó que el número de sitios de unión de cianuro al enzima de *Chlorella vulgaris* coincidía plenamente con su contenido en molibdeno. Basado en estos datos y en que las señales de EPR debidas al Mo(V) desaparecen rápidamente en presencia de NADH y cianuro (Solomonson, 1979), el grupo de Hewitt en Bristol (Inglaterra) ha propuesto un mecanismo para la inactivación de la nitrato reductasa según el cual la especie inactiva se trata de un complejo estable de Mo(V)-CN<sup>-</sup> (Hewitt *et al*, 1979; Hewitt y Notton, 1980). Por otra parte, Coughlan *et al* (1980) sugieren que todas las molibdoenzimas capaces de ser inactivadas por cianuro sufren una 'sobrerreducción' de sus centros de molibdeno por debajo de los niveles normales durante la catálisis. Según estos autores, la unión de cianuro al molibdeno parcialmente reducido (valencia V o IV) facilita su posterior sobrerreducción (valencia III o II), estado que persiste aún en la ausencia de cianuro unido. Esta última afirmación está en evidente contradicción con los resultados de Lorimer *et al* (1974), quienes encontraron que la nitrato reductasa inactiva de *C. vulgaris* contenía cianuro que era disociado al reactivar el enzima con ferricianuro. El mecanismo aquí propuesto indica que la especie inactiva de la

nitrate reductase de *A. braunii* se trata simplemente de una forma reducida del molibdeno del enzima en su estado de valencia V, y estabilizada por superóxido o cianuro (Fig. 42).

Un hecho importante que hay que tener en cuenta en lo concerniente a los estudios potenciométricos realizados sobre la interconversión de la nitrate reductase de *A. braunii*, es que el potencial normal encontrado para el proceso de inactivación (titulación reductiva) es notablemente menor que el del proceso de reactivación (titulación oxidativa). Esta diferencia puede tener únicamente dos explicaciones: 1) el grupo que se está titulando es distinto en ambos casos; y 2) el grupo redox es el mismo, pero en la inactivación sufre alguna modificación que hace que su potencial de reoxidación sea distinto. De acuerdo con la primera hipótesis, el reductor (ditiotionito) introduce los electrones en el enzima a un nivel distinto del molibdeno y luego, por la cadena de transporte del enzima, llegarían al molibdeno. La entrada de electrones en el enzima podría ser el citocromo  $b_{557}$ , cuyo potencial redox ( $E^{\circ}$ , pH 7, = -73 mV) es muy parecido al determinado para el proceso de inactivación ( $E^{\circ}$ , pH 7,5, = -50 mV). En el caso de que el reductor fuera el piridín nucleótido reducido, la vía de entrada de los electrones en el enzima serían los grupos -SH o el FAD. Al reactivar con ferricianuro el enzima inactivo, el potencial de +230 mV calculado correspondería al del par Mo(V)/Mo(VI). De acuerdo con la segunda hipótesis, esquematizada en la Fig. 43, el ditiotionito le daría los electrones directamente al molib

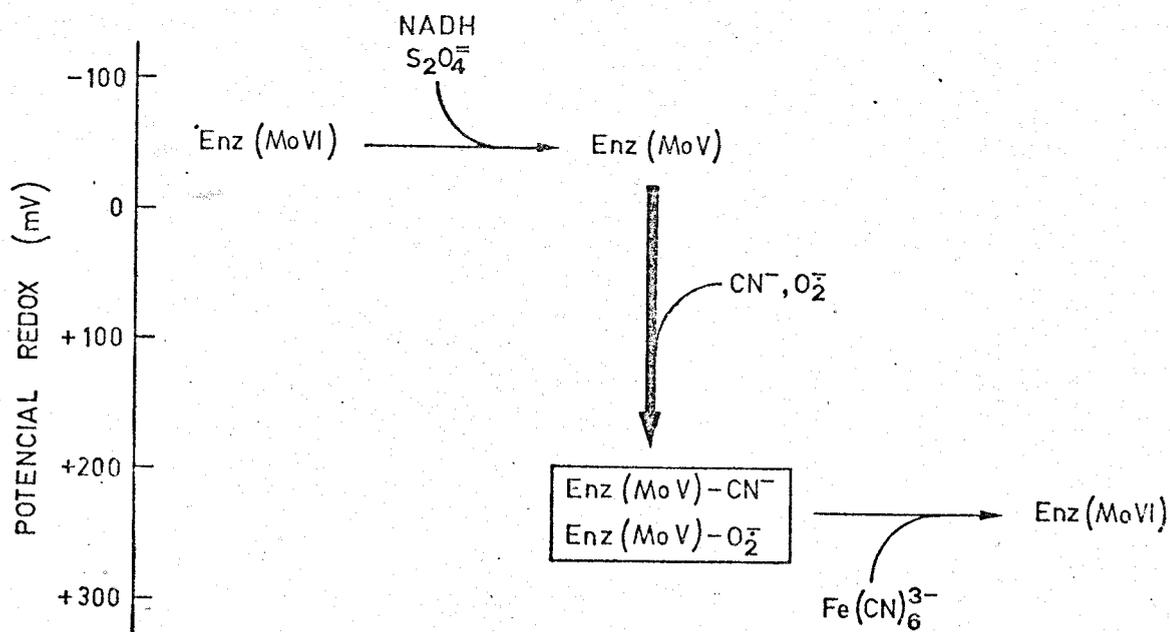


Figura 43. Hipótesis propuesta para explicar la diferencia encontrada en los potenciales redox de los procesos de inactivación y reactivación de la nitrato reductasa de *A. braunii*.

deno, siendo el potencial normal del par Mo(V)/Mo(VI) igual a -50 mV. El posterior acomplejamiento con cianuro de la forma reducida del par redox haría que ésta disminuyera su tensión de electrones, con lo que el potencial normal del nuevo par Mo(V)-CN<sup>-</sup>/Mo(VI) sería +230 mV.

Cammack *et al* (1976) han encontrado que en la flavomolibdo proteína xantina oxidasa, el ditionito interacciona con el enzima oxidado al nivel de la flavina, la cual es la vía de entrada de los electrones hacia el molibdeno. De hecho, el equilibrio del molibdeno con los mediadores redox se alcanza mucho más lentamente que lo hacen el FAD o el centro sulfoférrico del enzima. Igualmente, la reducción de la xantina deshidrogenasa, otro flavomolibdoenzima, por un exceso de ditionito ocurre en varias fases, siendo bastante lenta la última de ellas (NíFhaoláin y Coughlan, 1979). Bray *et al* (1975) explican esta fase lenta en base a que el ditionito interacciona con el enzima en el sitio de la flavina y, una vez alojados 4e del total de 6e necesarios para reducir completamente el enzima, los dos últimos entrarían con más dificultad al haber muy poca flavina oxidada disponible para recibir electrones. Estos resultados apoyarían la primera de nuestras hipótesis, según la cual el ditionito no sería capaz de interaccionar directamente con el molibdeno de la nitrato reductasa de *A. braunii* y, por tanto, los electrones entrarían a nivel de hemo para llegar a los centros de molibdeno. El hecho de que Jacob y Orme-Johnson (1980) hayan encontrado que la reducción del citocromo  $b_{557}$  de

la nitrato reductasa de *Neurospora crassa* y la aparición de señales de resonancia (EPR) debidas a Mo(V) ocurren a similares potenciales redox corroboran nuestros resultados.

El potencial redox del centro de molibdeno de la xantina oxidasa es mucho más negativo en el desulfoenzima (enzima inactivo) que en el enzima funcional (Cammack *et al*, 1976). Así, la conversión de la xantina oxidasa en su forma inactiva por el cianuro hizo que el potencial del par Mo(V)/Mo(VI) pasara de -355 mV a -440 mV. Por otra parte, la unión selectiva de algún tipo de ión por el Mo(V) hacía que el potencial del par Mo(V)/Mo(VI) fuera más positivo, a la vez que incrementaba la velocidad de reducción del molibdeno. Esto explicaría el hecho de que el potencial de dicho par fuera distinto según el tampón utilizado (Cammack *et al*, 1976). De acuerdo con estas observaciones, el molibdeno de la nitrato reductasa de *A. braunii* se comportaría de una forma similar: la unión del Mo(V) a ciertos iones, como el cianuro o el superóxido, haría que el potencial del par Mo(V)/Mo(VI) fuera más positivo, pasando de -50 mV a +230 mV. De cualquier forma, nuestros resultados no nos permiten decir cuál de las dos hipótesis aquí citadas es la correcta.

El potencial de óxido-reducción del molibdeno se ha medido por titulaciones potenciométricas y medidas cuantitativas del Mo(V) por EPR, en la nitrato reductasa disimilatoria de *Escherichia coli* y en otros enzimas. La Tabla XVI, donde se

TABLA XVI

POTENCIALES DE OXIDO-REDUCCION DEL MOLIBDENO EN ALGUNOS MOLIBDOENZIMAS

Enzima	Reacción catalizada	E <sub>0</sub> del par que interacciona con el molibdeno (mV)	Par redox	E <sub>0</sub> (mV)	Referencia
Xantina oxidasa	xantina + ác. urico	-440	Mo(V)/Mo(VI) Mo(IV)/Mo(V)	-355 -355	Cammack <i>et al</i> 1976
Desulfo-xantina oxidasa	- - -	-	Mo(V)/Mo(VI) Mo(IV)/Mo(V)	-440 -480	Cammack <i>et al</i> 1976
Sulfito oxidasa	sulfito + sulfato	-454	Mo(V)/Mo(VI) Mo(IV)/Mo(V)	+117 -110	Cramer <i>et al</i> 1980
Xantina deshidrogenasa	xantina + ác. úrico	-440	Mo(V)/Mo(VI) Mo(IV)/Mo(V)	-350 -362	Barber <i>et al</i> 1977
Nitrato reductasa disimilatoria	nitrato + nitrito	+420	Mo(V)/Mo(VI) Mo(IV)/Mo(V)	+220 +180	Vincent, 1979

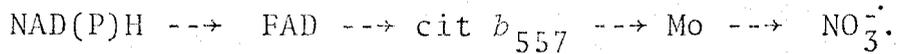
recogen los valores obtenidos, muestra que la nitrato reductasa de *E. coli* es un enzima anómalo comparado con otras molibdo-proteínas. El potencial redox de la reacción catalizada por el molibdeno es extremadamente bajo en todas las molibdo-proteínas, a excepción de la nitrato reductasa donde es bastante más alto. Es importante destacar que, a pesar de esta anomalía, el potencial redox del par nitrito/nitrato se corresponde con un alto potencial del molibdeno en la nitrato reductasa. Por otra parte, y por analogía con el valor de +220 mV calculado por Vincent (1979) para el potencial del par Mo(V)/Mo(VI) en la nitrato reductasa disimilatoria, el valor de +230 mV encontrado al realizar la titulación oxidativa de la nitrato reductasa de *A. braunii* podría corresponder al del par Mo(V)/Mo(VI) en este enzima.

De cualquier forma, es importante destacar la gran variabilidad del potencial de óxido-reducción del molibdeno, dependiendo del enzima donde se encuentre. No hay duda de que esta variabilidad responde a una diferencia en el ambiente que rodea al metal, lo que hace dudar del exacto significado de que el cofactor de molibdeno es 'común' para todas las molibdo-proteínas, a excepción de la nitrogenasa (Nason *et al*, 1971; Pienkos *et al*, 1977)

## V. CONCLUSIONES

1. La nitrato reductasa de *Ankistrodesmus braunii* se ha purificado hasta homogeneidad electroforética por un método basado fundamentalmente en la cromatografía de afinidad con azul-Sefarosa. Las preparaciones enzimáticas obtenidas presentaban una actividad específica de hasta 80 U/mg, lo que supone una purificación de unas 1.600 veces y una recuperación del 30% aproximadamente, respecto al extracto crudo.
2. La actividad NADH-nitrato reductasa presenta un mecanismo cinético del tipo ping pong bi bi. Por otra parte, el nitrato da lugar a una inhibición de tipo no competitivo respecto al NADH, lo que hace pensar que al final del ciclo catalítico hay una isomerización del enzima para regenerar la especie original.
3. La NAD(P)H-nitrato reductasa de *A. braunii* es un complejo enzimático de peso molecular 467.400, compuesto por ocho subunidades de 58.750, las cuales se disponen en forma de anillo ocupando alternativamente dos planos diferentes. La molécula presenta, por tanto, una simetría rotacional de ocho veces.
4. El complejo enzimático posee como grupos prostéticos 4 moléculas de FAD, 4 citocromos del tipo  $b_{557}$  y 2 átomos de molibdeno. Estos tres componentes participan secuencialmente en el transporte de electrones desde el piridín nucleótido

reducido hasta el nitrato, según el siguiente esquema:



5. La actividad enzimática de la nitrato reductasa se encuentra regulada por óxido-reducción. La inactivación del enzima se consigue por incubación aeróbica con NADH, siendo en este caso esencial la participación del radical superóxido, o bien con ditionito y cianuro. La actividad enzimática se recupera por oxidación con ferricianuro (en segundos) o con nitrato (en horas).
6. La interconversión de la nitrato reductasa es un proceso redox en el que se intercambia un solo electrón, siendo -50 mV el potencial normal, a pH 7,5, del proceso de inactivación y +230 mV el de la reactivación.
7. El centro de regulación está localizado al final de la cadena transportadora de electrones del enzima, probablemente en el molibdeno.

## VI. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, J. y Spiller, H. (1976) *Plant Cell Physiol.* 17, 1-10
- Alef, K. y Klemme, J.H. (1979) *Z. Naturforsch.* 34c, 33-37
- Alef, K., Burkardt, J.H., Horstmann, J.H. y Zumft, W.G. (1980) *Arch. Mikrobiol.*, en prensa
- Amy, N.K., Garrett, R.H. y Anderson, B.M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 480, 83-95
- Aparicio, P.J., Paneque, A., Rodríguez-López, M. y Losada, M. (1969) *Anal. Aula Dei* 10, 744-753
- Aparicio, P.J., Roldán, J.M. y Calero, F. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 70, 1071-1077
- Appleby, C.A. y Morton, R.K. (1959) *Biochem. J.* 73, 539
- Arnon, D.I., Losada, M., Nozaki, M. y Tagawa, K. (1961) *Nature* 190, 601-610
- Bailey, J.L. (1967) *Techniques in Protein Chemistry*, 2<sup>a</sup> edición, p. 340, Elsevier, Amsterdam
- Barber, J., Bray, R.C., Cammack, R. y Coughlan, M.P. (1977) *Biochem. J.* 163, 279-289
- Barea, J.L., Maldonado, J.M. y Cárdenas, J. (1976a) *Physiol. Plant* 36, 325-332
- Barea, J.L., Sosa, F. y Cárdenas, J. (1976b) *Z. Pflanzenphysiol.* 79, 237-245
- Beevers, L. y Hageman, R.H. (1969) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20, 495-522

Beevers, L. y Hageman, R.H. (1972) *Photophysiology* (Giese, A.C., ed.), Vol. 7, pp. 85-113, Academic Press, New York

Bergmeyer, H.U., Gawehn, K. y Grassl, M. (1974) en *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H.U., ed.), p. 459, Verlag Chemie, Weinheim

Betcher-Lange, S.L., Coughlan, M.P. y Rajagopalan, K.V. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 8825-8829

Beuscher, N., Mayer, F. y Gottschalk, G. (1974) *Arch. Mikrobiol.* 100, 307-328

Blume, K.G., Hoffbaner, R.W., Busch, D., Arnold, H. y Lorch, G.H. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 364-372

Bowen, H.J.M. (1966) *Trace Elements in Biochemistry*, p. 241, Academic Press, London

Bray, R.C. y Swann, J.C. (1972) *Structure and Bonding* 11, 107-144

Bray, R.C. (1975) en *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), 3<sup>a</sup> edición, Vol. 12, pp. 299-419, Academic Press, New York

Bray, R.C., Barber, M.J., Lowe, D.J., Fox, R. y Cammack, R. (1975) *FEBS Meet. Proc.* 40, 150-172

Burns, R.C. y Hardy, R.W.F. (1975) *Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants*, p. 189, Springer, Berlín

Cammack, R., Barber, M.J. y Bray, R.C. (1976) *Biochem. J.* 157, 469-478

Campbell, W.H. (1976) *Plant Sci. Lett.* 7, 239-247

- Campbell, W.H. y Smarelli, J. (1978) *Plant Physiol.* 61, 611-616
- Candau, P. (1979) Tesis doctoral, Universidad de Sevilla
- Candau, P., Manzano, C., Guerrero, M.G. y Losada, M. (1980) *Photobiochem. Photobiophys.* 1, 167-174
- Cárdenas, J. y Mortenson, L.E. (1974) *Anal. Biochem.* 60, 372-381
- Clark, L.J. y Axley, J.H. (1955) *Anal. Chem.* 27, 2000-2003
- Cleland, W.W. (1963a) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104-137
- Cleland, W.W. (1963b) *Nature* 198, 463
- Cleland, W.W. (1967) *Advances in Enzymology* (Nord, F.F., ed.), Vol. 29, pp. 1-32, Interscience, New York, London, Sydney
- Cohen, G. y Heikkila, R.E. (1977) en *Superoxide and Superoxide Dismutases* (Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I., eds.), pp. 351-366, Academic Press, London, New York, San Francisco
- Cohen, H.J. y Fridovich, I. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 367-373
- Coughlan, M.P., Johnson, J.L. y Rajagopalan, K.V. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 2694-2699
- Cramer, S.P., Gray, H.B., Scott, N.S., Barber, M. y Rajagopalan, K.V. (1980) en *Molybdenum Chemistry of Biological Sciences* (Newton, W.E. y Otsuka, S., eds.), pp. 157-168, Plenum Press, New York, London

- Cuatrecasas, P., Wilchek, M. y Anfinsen, C.B. (1968) *Biochemistry* 61, 636-643
- Cuatrecasas, P. (1970) *J. Biol. Chem.* 245, 3059-3065
- Chaparro, A., Maldonado, J.M., Diez, J. y Relimpio, A. (1976) *Plant sci. Lett.* 6, 335-342
- Chaparro, A., De la Rosa, M.A. y Vega, J.M. (1979) *Z. Pflanzenphysiol.* 95, 77-85
- De la Rosa, F.F. (1975) Tesis doctoral, Universidad de Sevilla
- De la Rosa, M.A. (1977) Tesina de Licenciatura, Universidad de Sevilla
- De la Rosa, M.A., Diez, J. y Vega, J.M. (1978) III Reunión de la SEFV, Resúmenes 49, Granada
- De la Rosa, M.A., Diez, J. y Vega, J.M. (1980a) *Rev. Esp. Fisiol.* 36, 177-182
- De la Rosa, M.A., Diez, J., Vega, J.M. y Losada, M. (1980b) *Eur. J. Biochem.* 106, 249-256
- Diez, J., Vega, J.M., Chaparro, A. y Relimpio, A. (1977) *Planta* 137, 231-234
- Diez, J. (1978) Tesis doctoral, Universidad de Sevilla
- Downey, R.J. y Steiner, F.X. (1979) *J. Bacteriol.* 137, 105-114
- Dutton, P.L. y Wilson, D.F. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 346, 165-212

Dutton, P.L. (1978) *Methods Enzymol.* 44, 411-435

Eady, R.R. y Smith, B.E. (1979) en *A Treatise on Dinitrogen Fixation* (Hardy, R.W.F., Bottomley, F. y Burns, R.C., eds.), Secciones I y II, pp. 399-490, Wiley and Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto

Eaglesham, A.R.J. y Hewitt, E.J. (1971) *Proc. Biochem. Soc.* 122, 18

Eaglesham, A.R.J. y Hewitt, E.J. (1975) *Plant. Cell Physiol.* 16, 1137-1149

Fernández, E. y Cárdenas, J. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, en prensa

Fido, R.J., Hewitt, E.J., Notton, B.A., Jones, O.T.G. y Nasrulhaq-Boyce, A. (1979) *FEBS Lett.* 99, 180-182

Flatmark, T. y Robinson, A.B. (1968) en *Structure and Function of Cytochromes* (Okunuki, K., Kamen, M.D. y Sekuzu, I., eds.), pp. 318-327, University of Tokyo Press, Tokyo, University Park Press, Baltimore, Maryland, Manchester

Florencio, F.J., Vega, J.M. y Losada, M. (1980) I Congreso Luso-Español de Bioquímica, Resúmenes P163, Coimbra (Portugal)

Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. y Walsby, A.E. (1973) *The Blue Green Algae*, Academic Press, London, New York

Fott, B. (1971) *Algenkunde*, 2<sup>a</sup> edición, Fischer Verlag, Stuttgart

Fridovich, I. (1974) *Advances in Enzymology* (Meister, A., ed.), Vol. 41, pp. 35-97, Interscience, New York, London, Sydney, Toronto

- Funkhouser, E.A. y Ackermann, R. (1976) *Eur. J. Biochem.* 66, 225-228
- Gall, J.L., Bruschi-Heriaud, M. y Dervartanian, D.V. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 234, 499-512
- Garner, C.D., Hyde, M.R., Mabbs, F.F. y Routledge, V.I. (1974) *Nature* 252, 579-580
- Garrett, R.H. y Nason, A. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 1603-1610
- Garrett, R.H. y Nason, A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2870-2882
- Garrett, R.H. y Greenbaum, P. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 302, 24-32
- Garrett, R.H. y Amy, N.K. (1978) *Adv. Mikrob. Physiol.* 18, 1-65
- Gewitz, H.-S., Lorimer, G.H., Solomonson, L.P. y Vennesland, B. (1974) *Nature* 249, 79-81
- Gewitz, H.-S., Pistorius, E.K., Voss, H. y Vennesland, B. (1976) *Planta* 131, 149-153
- Gewitz, H.-S., Piefke, J., Langowska, K. y Vennesland, B. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 611, 11-26
- Giri, L. y Ramadoss, C.S. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 11703-11712
- Greenwood, C. y Wilson, M.T. (1971) *Eur. J. Biochem.* 22, 5-10
- Greenbaum, P., Prodouz, K.N. y Garrett, R.H. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 526, 52-64

- Griffin, B. y Peterson, J.A. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 220-229
- Guerrero, M.G., Vega, J.M., Leadbetter, E. y Losada, M. (1973) *Arch. Mikrobiol.* 91, 287-304
- Guerrero, M.G. y Gutiérrez, M. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 482, 272-285
- Guerrero, M.G., Vega, J.M. y Losada, M. (1981) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, en prensa
- Hageman, R.H. y Hucklesby, D.P. (1971) *Methods Enzymol.* 23, 491-503
- Hale, G. y Perham, R.N. (1979) *Eur. J. Biochem.* 94, 119-126
- Halliwell, B. (1977) en *Superoxide and Superoxide Dismutases* (Michelson, A.M., McCord, J.M. y Fridovich, I., eds.), pp. 335-350, Academic Press, London, New York, San Francisco
- Hattori, A. (1970) *Plant Cell Physiol.* 11, 975-978
- Hedrick, J.L. y Smith, A.J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155-164
- Herrera, J., Paneque, A., Maldonado, J.M., Barea, J.L. y Losada, M. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, 996-1003
- Hewitt, E.J. (1975) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 73-100
- Hewitt, E.J., Hucklesby, D.P. y Notton, B.A. (1976) en *Plant Biochemistry* (Bonner, J. y Varner, J.E., eds.), pp. 633-681, Academic Press, New York, London

- Hewitt, E.J., Notton, B.A. y Garner, C.D. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* 7, 629-633
- Hewitt, E.J. y Notton, B.A. (1980) en *Molybdenum and Molybdenum-containing Enzymes* (Coughlan, M., ed.), pp. 273-325, Pergamon Press, Oxford, New York
- Jacq, C. y Lederer, F. (1972) *Eur. J. Biochem.* 25, 41-48
- Jacob, G.S. y Orme-Johnson, W.H. (1980) en *Molybdenum and Molybdenum-containing Enzymes* (Coughlan, M., ed.), pp. 327-344, Pergamon Press, Oxford, New York
- Jetschmann, K., Solomonson, L.P. y Vennesland, B. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 275, 276-278
- Johnson, J.L. y Rajagopalan, K.V. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 2017-2025
- Johnson, J.L. (1980) en *Molybdenum and Molybdenum-containing Enzymes* (Coughlan, M., ed.), pp. 345-383, Pergamon Press, Oxford, New York
- Johnson, J.L., Hainline, B.E. y Rajagopalan, K.V. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1783-1786
- Jovin, T., Charamback, A. y Naughton, M.A. (1964) *Anal. Biochem.* 9, 351-369
- Kajihara, T. y Hagihara (1968) en *Structure and Function of Cytochromes* (Okunuki, K., Kamen, M.D. y Sekuzu, I., eds.), pp. 581-593, University of Tokyo Press, Tokyo, University Park Press, Baltimore, Maryland, Manchester
- Kessler, E., Langner, W., Ludewig, I. y Wiechmann, H. (1963) en *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*, pp. 7-20, Japan. Soc. Plant Physiol., Tokyo

Kessler, E. (1976) *Prog. Bot.* 38, 108-117

Ketchum, P.A., Taylor, R.C. y Young, D.C. (1976) *Nature* 259, 202-204

King, T.E. y Morris, R.O. (1967) *Methods Enzymol.* 10, 634-641

Kinsky, S.G. y McElroy, W.D. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* 73, 466-483

Kleinschmidt, J.A. y Kleiner, D. (1978) *Eur. J. Biochem.* 89, 51-60

Klotz, I.M., Darnall, D.W. y Langerman, N.R. (1973) en *The Proteins* (Neurath, H., Hill, R.L. y Boeder, C.-L., eds.), 3<sup>a</sup> edición, Vol. 3, pp. 293-411, Academic Press, New York, San Francisco, London

Kopperschlager, G., Diezel, W., Freyer, R., Liebe, St. y Hofmann, E. (1971) *Eur. J. Biochem.* 22, 40-45

Koziol, J. (1971) *Methods Enzymol.* 18, 253-285

Kuo, T., Kleinhofs, A. y Warner, R.L. (1980) *Plant Sci. Lett.* 17, 371-381

Lancaster, J.R., Vega, J.M., Kamin, H., Orme-Johnson, N.R., Orme-Johnson, W.H., Krueger, R.J. y Siegel, L.M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1268-1272

Laurent, T.C. y Killander, J. (1964) *J. Chromatog.* 14, 317-330

Loach, P.A. (1973) en *Handbook of Biochemistry Selected Data for Molecular Biology* (Sober, H.A., ed.), 2<sup>a</sup> edición, pp. J33-J40, CRC Press, Cleveland, Ohio

Lorimer, G.H., Gewitz, H.-S., Völker, W., Solomonson, L.P. y Vennesland, B. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 6074-6079

Losada, M., Aparicio, P.J. y Paneque, A. (1969) en *Progress in Photosynthesis Research* (Metzner, H., ed.), Vol. 3, p. 1504, Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Tübingen

Losada, M., Paneque, A., Aparicio, P.J., Vega, J.M., Cárdenas, J. y Herrera, J. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 1009-1015

Losada, M. (1972) Discurso de Ingreso en la Real Academia de Ciencias, Madrid

Losada, M., Herrera, J., Maldonado, J.M. y Paneque, A. (1973) *Plant Sci. Lett.* 1, 31-37

Losada, M. (1974) en *Metabolic Interconversion of Enzymes. 3th International Symposium, Seattle 1973* (Fischer, E.H., Krebs, E. G., Neurath, H. y Stadman, E.R., eds.), pp. 257-270, Springer-Verlag, Berlin

Losada, M. (1976a) *J. Mol. Catal.* 1, 245-264

Losada, M. (1976b) en *Reflections on Biochemistry* (Kornberg, A., Cornudella, L., Horecker, B.L. y Oró, J., eds.), pp. 73-84, Pergamon Press, Oxford

Losada, M. y Guerrero, M.G. (1979) en *Photosynthesis in Relation to Model Systems* (Barber, J., ed.), pp. 365-408, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam

Losada, M., Vega, J.M. y Guerrero, M.G. (1981) en *Biochemistry and Physiology of Nitrogen and Sulfur Metabolism* (Trebst, A. y Bothe, H., eds.), Springer Verlag, Berlín, en prensa

- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Lück, H. (1965) en *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U., ed.), pp. 868-888, Academic Press, New York
- Llobell, A., Bárcena, J.A., Vila, R. y Paneque, A. (1980) *Z. Pflanzenphysiol.* 98, 271-276
- Maldonado, J.M., Herrera, J., Paneque, A. y Losada, M. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 51, 27-33
- Maldonado, J.M., Notton, B.A. y Hewitt, E.J. (1980) *Ann. Rep. Long Ashton Res. stn. for 1978*, 74-75
- Manzano, C., Candau, P., Gómez-Moreno, C., Relimpio, A. y Losada, M. (1976) *Mol. Cell. Biochem.* 10, 161-169
- Margolis, J. y Wrigley, C.W. (1975) *J. Chromatog.* 106, 204-209
- Markham, R., Frey, S. y Hills, G.J. (1963) *Virology* 20, 88-102
- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379
- Massey, V., Palmer, G. y Ballou, D. (1971) en *Flavins and Flavoproteins. Third International Symposium* (Kamin, H., ed.), pp. 349-361, University Park Press, Baltimore, Butterworths, London
- Matsubara, H. y Sasaki, R.M. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35, 175-181
- Mayhew, S.G. y Ludwig, M.L. (1975) en *The Enzymes* (Boyer, P., ed.), 3<sup>a</sup> edición, pp. 57-118, Academic Press, New York
- McDonald, D.W. y Coddington, A. (1974) *Eur. J. Biochem.* 46, 169-178

Moore, S. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 235-237

Moreno, C.G., Aparicio, P.J., Palacián, E. y Losada, M. (1972) *FEBS Lett.* 26, 11-14

Moreno, C.G. y Palacián, E. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 269-273

Morris, I. (1974) en *Algal Physiology and Biochemistry* (Stewart, W.P.D., ed.), pp. 583-609, Blackwell, Oxford

Nason, A., Lee, K.-Y., Pan, S.-S., Ketchum, P.A., Lamberti, A. y DeVries, J. (1971) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 3242-3246

NíFhaoláin, I. y Coughlan, M.P. (1979) *Proceedings of the Royal Irish Academy* 79, 111-122

Notton, B.A., Fido, R.J. y Hewitt, E.J. (1977) *Plant Sci. Lett.* 8, 165-170

Notton, B.A. y Hewitt, E.J. (1979) en *Nitrogen Assimilation in Plants* (Hewitt, E.J. y Cutting, C.V., eds.), pp. 227-244, Academic Press, New York

Ortega, T., Castillo, F. y Cárdenas, J. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 885-891

Palacián, E., De la Rosa, F.F., Castillo, F. y Gómez-Moreno, C. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 161, 441-447

Palmer, G. y Massey, V. (1968) en *Biological Oxidations* (Singer, T.P., ed.), p. 263, Interscience, New York

Pan, S.-S. y Nason, A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 523, 297-313

- Paneque, A., Del Campo, F.F., Ramírez, J.M. y Losada, M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 109, 79-85
- Paneque, A. y Losada, M. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 128, 202-204
- Paneque, A., Aparicio, P.J., Catalina, L. y Losada, M. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 162, 149-151
- Paul, K.G., Theorell, H. y Akeson, A. (1953) *Acta Chem Scand.* 7, 1284
- Payne, W.J. (1973) *Bacteriol. Rev.* 37, 409-452
- Peterson, G.L. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 201-220
- Pienkos, P.T., Shah, V.K. y Brill, W.J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5469-5471
- Pistorius, E.K., Gewitz, H.-S., Voss, H. y Vennesland, B. (1976) *Planta* 128, 73-80
- Pistorius, E.K., Funkhouser, E.A. y Voss, H. (1978) *Planta* 141, 279-282
- Prusiner, S. y Stadtman, E.R. (1973) *The Enzymes of Glutamine Metabolism*, Academic Press, New York, London
- Relimpio, A., Aparicio, P.J., Paneque, A. y Losada, M. (1971) *FEBS Lett.* 17, 226-230
- Rideal, E.K. y Roberts, R. (1951) *Proc. R. Soc. Lond. Ser. A* 205, 391
- Rigano, C. (1970) *Arch. Mikrobiol.* 70, 147-156

- Roustan, J.L., Neuburger, M. y Fourcy, A. (1974) *Physiol. Veg.* 12, 527-544
- Ryan, L.D. y Vestling, C.S. (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 279-284
- Schachman, H.K. (1957) *Methods Enzymol.* 4, 32-103
- Shen, T.-C., Funkhouser, E.A. y Guerrero, M.G. (1976) *Plant Physiol.* 58, 292-294
- Siegel, L.M. y Monty, K.J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112, 346-362
- Siegel, L.M., Murphy, M.J. y Kamin, H. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 251-264
- Small, I.S. y Wray, J.L. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* 7, 737-739
- Small, I.S. y Wray, J.L. (1980) *Phytochemistry* 19, 387-394
- Snell, F.D. y Snell, C.T. (1949) *Colorimetric Methods of Analysis*, p. 804, D. Van Nostrand Company, New York
- Sober, H.A., Hartley, R.W., Carroll, W.R. y Peterson, E.A. (1965) en *The Proteins* (Neurath, H., ed.), 2<sup>a</sup> edición, Vol.3, pp. 2-97, Academic Press, New York, London
- Solomonson, L.P. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 334, 297-308
- Solomonson, L.P., Lorimer, G.H., Hall, R.L., Borchers, R. y Bailey, J.L. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4120-4127

- Solomonson, L.P. (1975) *Plant Physiol.* 56, 853-855
- Solomonson, L.P. y Spehar, A.M. (1977) *Nature* 265, 373-375
- Solomonson, L.P. (1979) en *Nitrogen Assimilation in Plants* (Hewitt, E.J. y Cutting, C.V., eds.), pp. 199-205, Academic Press, New York
- Solomonson, L.P. y Spehar, A.M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 2176-2179
- Southerland, W.H., Winge, D.R. y Rajagopalan, K.V. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 8747-8752
- Spackman, D.H., Stein, W.H. y Moore, S. (1958) *Anal. Chem.* 30, 1190-1206
- Srivastava, H.S. (1980) *Phytochemistry* 19, 725-733
- Staal, G.E.H., Koster, J.F., Kamp, H., Van Milligen-Boersma, L. y Veeger, C. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 86-96
- Stiefel, E.I. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 988-992
- Syrett, P.J. y Morris, I. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 566-575
- Syrett, P.J. y Leftley, J.W. (1976) en *Perspectives in Experimental Biology* (Sunderland, N., ed.), Vol. 2, pp. 221-234, Pergamon Press, Oxford
- Thompson, S.T., Cass, H.H. y Stellwager, E. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 669-672
- Ullrich, W.R. (1980) en *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series* (Lüchli, A. y Bieleski, E., eds.), Vol. 6, Springer, Berlin, en prensa

- Valentine, R.C., Shapiro, B.M. y Stadtman, E.R. (1968) *Biochemistry* 7, 2143-2152
- Van de Bogart, M. y Beinert, H. (1967) *Anal. Biochem.* 20, 325-334
- Vega, J.M., Herrera, J., Aparicio, P.J., Paneque, A. y Losada, M. (1971) *Plant Physiol.* 48, 294-299
- Vega, J.M., Herrera, J., Relimpio, A. y Aparicio, P.J. (1972) *Physiol. Veg.* 10, 637-652
- Vega, J.M., Garrett, R.H. y Siegel, L.M. (1975a) *J. Biol. Chem.* 250, 7980-7989
- Vega, J.M., Greenbaum, P. y Garrett, R.H. (1975b) *Biochim. Biophys. Acta* 377, 251-257
- Vega, J.M. y Kamin, H. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 896-909
- Vega, J.M., Cárdenas, J. y Losada, M. (1980) *Methods Enzymol.* 69, 255-270
- Vennesland, B. y Guerrero, M.G. (1979) en *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series* (Gibbs, M. y Latzko, E., eds.), Vol. 6, pp. 425-444, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg
- Villalobo, A., Roldán, J.M., Rivas, J. y Cárdenas, J. (1977) *Arch. Mikrobiol.* 112, 127-132
- Vincent, S.P. (1979) *Biochem. J.* 177, 757-759
- Wallace, W. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 341, 265-276
- Wallace, W. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 524, 418-427

- Weber, K. y Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4406-4412
- Wilcheck, M. y Jakoby, W.B. (1974) *Methods Enzymol.* 34, 3-10
- Withfield, C.D. y Mayhew, S.G. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2801-2810
- Wray, J.L., Small, I.S. y Brown, J. (1979) *Biochem. Soc. Trans.* 7, 739-741
- Yates, M.G. (1976) *Trends Biochem. Sci.* 1, 17-20
- Yonetani, T. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 4509-4514
- Zumft, W.G., Aparicio, P.J., Paneque, A. y Losada, M. (1970) *FEBS Lett.* 9, 157-160
- Zumft, W.G. (1976) *Structure and Bonding* 29, 1-65
- Zumft, W.G. y Cárdenas, J. (1979) *Naturwissenschaften* 66, 81-88
- Zumft, W.G., Castillo, F. y Hartman, K.M. (1980) en *The Blue Light Syndrome* (Senger, H., ed.), pp. 422-428, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
a las 10 de la mañana de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. Manuel Angel de la Rosa Acosta  
sobre "Composición, estructura y propiedades  
físico-químicas del complejo surimato  
WAD (D,N)-nitato reductasa del Alga Verde, Anisotrichomonas  
Braunii"  
y otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE  
cum laude

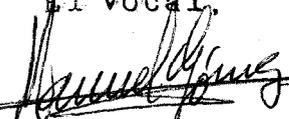
Sevilla, 9 de Febrero 1.981

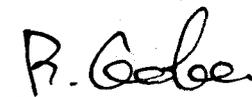
El Vocal,

El Vocal,

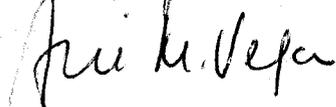
El Vocal,

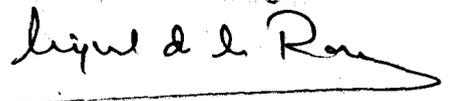
  
Presidente.

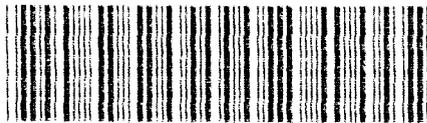
  
El Secretario,

  
El Doctor:









500292362

FBI E TO-006

292362