

PURIFICACION HASTA HOMOGENEIDAD Y ESTUDIOS DE REGULACION DEL
COMPLEJO ENZIMATICO NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA DEL ALGA VERDE

Ankistrodesmus braunii

31-4-78

511

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias
por el Licenciado Jesús Díez Dapena

Jesús Díez

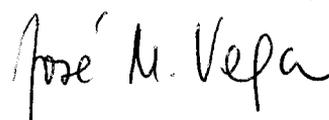
Sevilla, Septiembre de 1978

PONENTE

DIRECTOR



Prof. Manuel Losada Villasanté
Catedrático de Bioquímica



Dr. José M. Vega Piqueras
Colaborador Científico del
C.S.I.C.

TD 518



A mis padres

A Carmen

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla.

En primer lugar quiero expresar al Profesor D. Manuel Losada, de quien he recibido durante los años de mi Licenciatura y de la realización de este trabajo grandes enseñanzas, mi agradecimiento por acogerme en su Departamento.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. José M. Vega por su constante interés a mi formación, así como por su labor en la dirección de esta Tesis. Asimismo deseo expresar especial agradecimiento a mi compañero Miguel A. De la Rosa por su contribución en la obtención de los resultados que aquí se presentan.

Deseo especialmente agradecer a los doctores José M. Maldonado y Alicia Chaparro, con quienes me inicié en las tareas investigadoras, su paciente dedicación a mi formación científica.

Mi sincero agradecimiento a los doctores Miguel G. Guerrero y Francisco Sosa por su aportación de ideas y labor crítica, así como a mis compañeros del Departamento por su colaboración y apoyo. Igualmente a José Moreno y María Josefa Perez de León por su ayuda en la realización y composición de esta Tesis.

INDICE

ABREVIATURAS	VII
I. INTRODUCCION.....	1
II. MATERIALES Y METODOS.....	17
II.1. CULTIVO DE CELULAS.....	18
II.1.1. <i>Organismo empleado y condiciones standard de cultivo</i>	18
II.1.2. <i>Condiciones especiales de cultivo</i>	19
II.2. ENZIMAS.....	20
II.2.1. <i>Preparación de extractos crudos</i>	20
II.2.1.1. <u>Recogida de células</u>	20
II.2.1.2. <u>Rotura de células</u>	20
II.2.2. <i>Purificación parcial de la nitrato reductasa de <u>A. braunii</u></i>	22
II.2.3. <i>Determinación de actividades enzimáticas</i> ..	24
II.2.3.1. <u>Actividad NAD(P)H-nitrato reductasa</u> ...	24
II.2.3.2. <u>Actividad NAD(P)H-diaforasa</u>	25
II.2.3.3. <u>Actividades FMNH₂ y MVH-nitrato reductasa</u>	25
II.3. TECNICAS EXPERIMENTALES Y DETERMINACIONES ANALITICAS.....	26
II.3.1. <i>Medida del crecimiento</i>	26
II.3.2. <i>Determinación de nitrato</i>	26
II.3.3. <i>Determinación de nitrito</i>	27

II.3.4. <i>Determinación de proteína</i>	28
II.3.5. <i>Determinaciones espectrofotométricas</i>	28
II.3.6. <i>Preparación de la Sefarosa-Azul Dextrano</i>	29
II.3.7. <i>Electroforesis analíticas en gel de poli acrilamida</i>	30
II.3.7.1. <u>Tinción de proteína en el gel</u>	30
II.3.7.2. <u>Ensayo de actividad nitrato reducta- sa en geles de electroforesis</u>	31
II.3.7.3. <u>Tinción del hemo en geles de elec- troforesis</u>	32
II.4. REACTIVOS Y APARATOS.....	32
II.4.1. <i>Procedencia de los reactivos empleados</i> ..	32
II.4.2. <i>Aparatos utilizados</i>	33
III. RESULTADOS.....	35
III.1. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON SEFAROSA-AZUL DEXTRANO DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>A. brau ni</u>	36
III.1.1. <i>Condiciones óptimas de adsorción del enzima a la Sefarosa</i>	36
III.1.2. <i>Elución del enzima</i>	39
III.2. PURIFICACION HASTA HOMOGENEIDAD DE LA NITRA TO REDUCTASA DE <u>A. braunii</u>	44
III.2.1. <i>Método de purificación</i>	44
III.2.2. <i>Pureza del enzima y separación de iso- enzimas</i>	45
III.2.3. <i>Especificidad de los isoenzimas nitra- to reductasa de <u>A. braunii</u> por piridin nucleótidos reducidos</i>	49

III.3. CARACTERIZACION DEL GRUPO HEMO COMPONENTE DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>A. braunii</u>	51
III.3.1. <i>Espectro de absorción de la nitrato reductasa de <u>A. braunii</u></i>	51
III.3.2. <i>Espectro de absorción del derivado piridin-hemocromógeno de la nitrato reductasa de <u>A. braunii</u></i>	54
III.4. REGULACION DEL COMPLEJO NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA DE <u>A. braunii</u>	56
III.4.1. <i>Regulación a nivel de síntesis del enzima</i>	56
III.4.2. <i>Regulación de la actividad nitrato reductasa</i>	63
III.4.2.1. <u>Interconversión in vivo de la nitrato reductasa de A. braunii</u> ...	63
III.4.2.2. <u>Interconversión in vitro de la nitrato reductasa de A. braunii</u> .	71
IV. DISCUSION.....	82
V. CONCLUSIONES.....	101
VI. BIBLIOGRAFIA.....	105

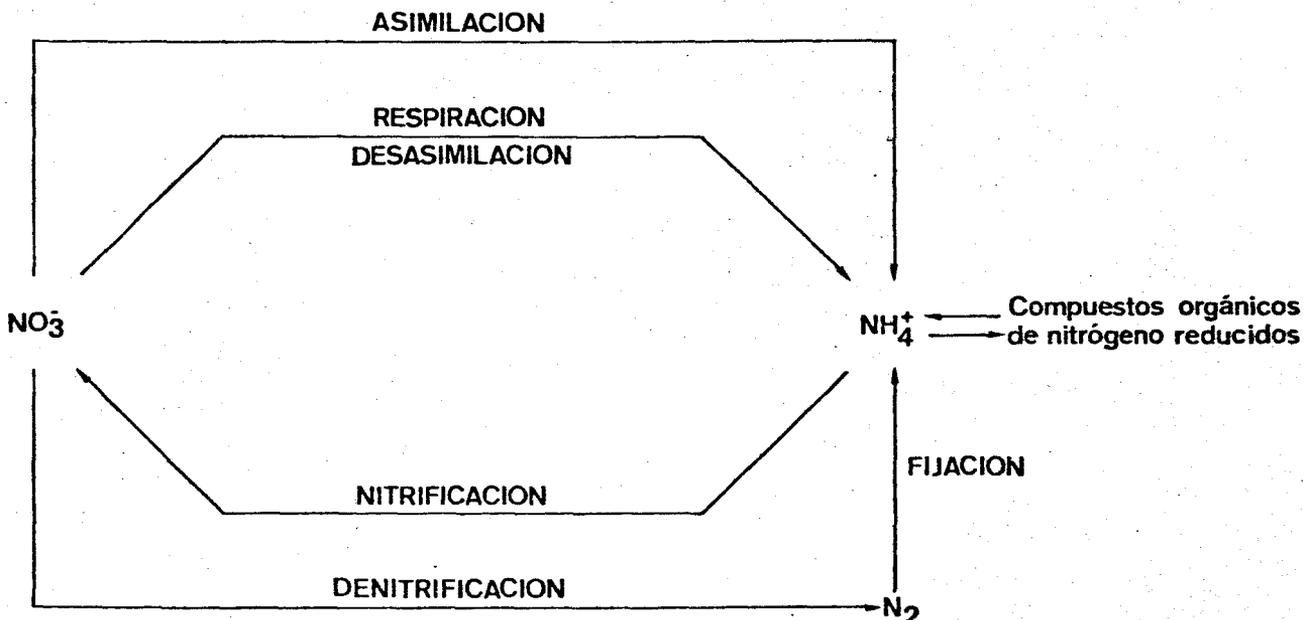
ABREVIATURAS

A.....	Absorbancia
ADP.....	Adenosina-5'-difosfato
AMP.....	Adenosina-5'-monofosfato
ATP.....	Adenosina-5'-trifosfato
DPIP.....	2,6,diclorofenol-indofenol
DTE.....	Ditioeritritol
EDTA.....	Acido etilén-diaminotetraacético
FAD.....	Flavín-adenín-dinucleótido
FMN.....	Flavín-adenín-mononucleótido
FMNH ₂	Flavín-adenín-mononucleótido reducido
FNH ₂	Flavín-nucleótido-reducido
g.....	Aceleración de la gravedad
GDP.....	Guanosina-5'-difosfato
MV.....	Metil viológeno
MVH.....	Metil viológeno reducido
NAD (P) ⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido (fosfato)
NAD (P)H.....	Nicotinamida-adenín-dinucleótido (fosfato) reducido
NO ₃ Rasa.....	Nitrato reductasa
Tris.....	Tri-(hidroximetil)-aminometano

I. INTRODUCCION

El nitrógeno existe en múltiples estados de oxidación en la naturaleza, que oscilan entre +5 del nitrato (nitrógeno oxidado), y -3 del amoníaco y sus derivados (nitrógeno reducido). El nitrógeno reducido aparece en compuestos orgánicos esenciales a todos los organismos vivos, como aminoácidos y proteínas, nucleótidos y ácidos nucleicos, coenzimas y otros metabolitos celulares. 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 formas óxidadas y reducidas de nitrógeno pueden interconvertirse en la biosfera por procesos metabólicos que vistos en conjunto constituyen el "ciclo del nitrógeno" que se indica en el siguiente esquema:



Es evidente que no existe ningún organismo que pueda catalizar todas las reacciones mostradas en el esquema anterior debido a su gran complejidad.

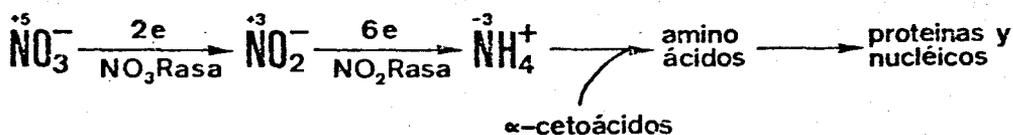
La reducción asimilatoria de nitrato hasta amoníaco está ampliamente distribuida, tanto en organismos fotosintéticos (plantas superiores, algas verdes y bacterias fotosintéticas) como no fotosintéticos (hongos, levaduras y bacterias). En general se trata de un proceso no cíclico, que requiere poder reductor (ocho equivalentes por molécula de nitrato) y no necesita ATP. Por otra parte la fijación de nitrógeno molecular, es también un proceso de tipo asimilatorio que realizan las bacterias fotosintéticas (Arnon et al. 1961; Fogg et al., 1973) y no fotosintéticas, tanto obligadas anaerobias como anaerobias facultativas y aerobias (Yates, 1976), este proceso requiere además de poder reductor (6 equivalentes por molécula de nitrógeno), el concurso energético del ATP.

Hay un pequeño número de bacterias capaces de interconvertir los distintos compuestos de nitrógeno inorgánico y obtener energía, por fosforilación acoplada al transporte de electrones para su crecimiento y desa-

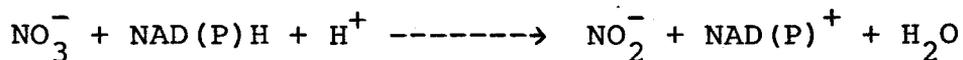
rollo. Entre ellas destacan bacterias quimiolitotrófi-
cas nitrificantes (que oxidan el amonio hasta nitrato
o nitrito), bacterias que utilizan el nitrato, en au-
sencia de oxígeno, como aceptor terminal de electrones
de la cadena respiratoria, y por último las bacterias
denitrificantes, que reducen el nitrato y óxidos de ni-
trógeno en general hasta nitrógeno molecular (Zumft y
Cárdenas, in press).

En organismos fotosintéticos la reducción a-
similatoria de nitrato hasta amoniaco transcurre en dos
etapas enzimáticas : la primera consiste en la reducción
de nitrato a nitrito, con transferencia de dos electro-
nes, catalizada por el complejo enzimático NAD(P)H-nitra-
to reductasa (E.C.1.6.6.2.), y la segunda, la reducción
de nitrito hasta amoniaco, con transferencia de seis e-
lectrones catalizada por la ferredoxina-nitrito reducta-
sa (E.C.1.7.7.1.) (Hewitt, 1975).

El proceso considerado puede esquematizarse de
la siguiente forma:



La primera de estas reacciones, es decir, la reducción de nitrato a nitrito se puede esquematizar como sigue :



$$\Delta G'_0, \text{ pH } 7 = -34 \text{ kcal/mol}$$

En la transferencia de electrones desde el piridín nucleótido reducido hasta el nitrato participan secuencialmente dos actividades. Estas actividades pueden ensayarse separadamente y, cada una comprende una parte de la cadena transportadora de electrones de todo el complejo enzimático. La acción de la diaforasa (o NAD(P)H-deshidrogenasa), que constituye la primera mitad del complejo enzimático, supone la reducción por NAD(P)H de una variedad de aceptores (de uno o dos electrones) del tipo del citocromo c, ferricianuro, DPIP, etc... (Paneque et al., 1968; Paneque y Losada, 1966; 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, utilizando como donador de electrones flavín nucleótidos o viológenos reducidos químicamente con ditionito (Losada et al., 1969).

Estas actividades (NAD(P)H-diaforasa y FNH_2 -MVH-nitrato reductasa) se afectan de forma diferente por tratamientos selectivos o inhibidores y también pueden ser específicamente protegidas contra su inactivación, o reactivadas, por sus sustratos correspondientes (o análogos de esos sustratos). En general, la mitad diaforasa es muy sensible al calentamiento a temperaturas suaves y al tratamiento con mercuriales del tipo del p-cloromercu-ribenzoato (p-CMB), que reacciona con los grupos sulfhidrilos (-SH) de la proteína. Ambos procesos pueden prevenirse de una forma específica por la presencia de FAD, grupo prostético de la diaforasa o de NAD(P)H, donadores fisiológicos del enzima (Losada, 1976 a). Por otra parte, la nitrato reductasa terminal, que es notablemente resistente al tratamiento térmico y al p-CMB, puede ser total y específicamente inhibida por compuestos quelantes de metales, del tipo de la azida, cianuro, cianato y carbamil-fosfato. En todos los casos la inhibición es de tipo competitivo con respecto al nitrato (Vega et al., 1972).

Muchos intentos se han hecho para purificar la nitrato reductasa de organismos fotosintéticos con resul

tados poco satisfactorios, ya que hasta 1975 solo se habían conseguido preparaciones enzimáticas parcialmente purificadas (Hewitt, 1975). El enzima de Chlorella vulgaris ha sido el primero purificado hasta homogeneidad (Solomonson et al., 1975). Se trata de un complejo enzimático, de peso molecular 356.000, que tiene al menos tres subunidades de 100.000 daltons, y posee, por molécula de enzima, dos moléculas de FAD, citocromo b_{557} y molibdeno como grupos prostéticos (Solomonson et al., 1975).

La nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii se ha purificado por un método que incluye tan solo técnicas convencionales (Ahmed y Spiller, 1976), necesitándose varios días para obtener una preparación enzimática con una actividad específica de 0,6 U/mg, que supone con respecto al extracto crudo un factor de purificación de 30 veces y una recuperación de un 30%. El enzima de este alga que utiliza indistintamente NADH o NADPH como donador de electrones es un complejo enzimático, de peso molecular 475.000 (Ahmed y Spiller, 1976), que contiene FAD y probablemente molibdeno (Zumft et al., 1972) y citocromo b (Ahmed y Spiller, 1976).

Sin embargo, dada la poca calidad de la preparación de la nitrato reductasa de A. braunii obtenida por Ahmed y Spiller (1976), pensamos que este enzima sería un excelente candidato para purificarlo, estudiar su composición y abordar a nivel molecular el mecanismo de regulación de la asimilación de nitrato en algas verdes, proceso de gran interés y repercusión biológica.

Recientemente ha despertado gran interés la utilización de la cromatografía de afinidad para la purificación de las proteínas y otras estructuras biológicas (Wilcheck y Jacoby, 1974). Dicha técnica se basa en el alto grado de especificidad de las interacciones biológicas, como pueden ser las interacciones enzima-sustrato, enzima-inhibidor competitivo, antígeno-anticuerpo, etc... (Cuatrecasas et al., 1968). Consiste en una cromatografía de adsorción en la que se utiliza una matriz insoluble y porosa a la que se une, después de activada químicamente, un ligando que presenta afinidad por la estructura que se quiere aislar.

Los derivados de agarosa (Hjertén, 1962) presentan propiedades adecuadas para ser utilizados como matriz adsorbente y pueden ser activados fácilmente con

bromuro de cianógeno (Axen et al., 1967; March et al., 1974) para la posterior unión de cualquier ligando que contenga grupos aminos.

El Azul Dextrano se ha utilizado para purificación por cromatografía de afinidad del complejo enzimático nitrato reductasa de varios organismos; Chlorella vulgaris (Solomonson, 1975), Rhodotorula glutinis (Guerrero y Gutierrez, 1977), plántulas de arroz (Shen et al., 1976), y de otros enzimas como la fosfofructoquinasa (Kopperschlager et al., 1971), piruvatoquinasa (Blume et al., 1971; Staal et al., 1971), láctico deshidrogenasa (Ryan y Vestling, 1974) y otras (Thompson et al., 1975).

La unión del Azul Dextrano a dichas proteínas es posible gracias a su especificidad por un determinado tipo de estructura denominado "pliegue dinucleotídico" (Thompson et al., 1975) conocido por formar el sitio de unión para los nucleótidos en diferentes enzimas.

Según los resultados obtenidos por Böhme et al. (1972) el grupo cromóforo del Azul Dextrano, 4-fenilamino-1-aminoantroquinona, unido covalentemente al Dextrano

2.000, es el responsable de tales interacciones. Dicho grupo puede adoptar una conformación que simula la orientación de los anillos aromáticos y grupos aniónicos característicos de los nucleótidos (Thompson et al., 1975).

Se ha puesto a punto un sencillo método de purificación para la nitrato reductasa de A. braunii, que incluye como etapa principal, una cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano. Este método permite obtener en 1-2 días suficiente cantidad de enzima puro con alta actividad específica (49 U/mg) que es muy adecuado para estudiar sus propiedades fisico-químicas y regulatorias.

Se ha hecho también una caracterización exahustiva del componente hemínico del enzima que hemos identificado como citocromo b_{557} , grupo que se ha descrito como componente en todas las nitrato reductasas que se han purificado adecuadamente (Vennesland y Guerrero, in press).

Beevers y Hageman (1969), han concluido que el enzima limitante en la asimilación de nitrato es la ni-

trato reductasa. Nitrito y amonio están normalmente presentes en las células vegetales en pequeñas cantidades, salvo en circunstancias excepcionales; sin embargo la concentración intracelular de nitrato puede alcanzar altos niveles, presumiblemente en la vacuola. Por ello los estudios acerca del mecanismo de regulación de la asimilación del nitrato se han enfocado fundamentalmente sobre la nitrato reductasa.

En cuanto a la síntesis y degradación del enzima en plantas superiores y algas, las actividades del sistema asimilatorio reductor de nitrato (i.e. nitrato y nitrito reductasas) varían con la intensidad de luz, niveles de CO_2 , temperatura y fuente de nitrógeno (Beever y Hageman, 1969; Losada, 1974; Morris, 1974). En general ~~estos enzimas presentan máximo nivel cuando las células~~ se crecen con nitrato como única fuente de nitrógeno y su nivel es prácticamente nulo en células creciendo en amonio.

El complejo NAD(P)H-nitrato reductasa del alga verde Ankistrodesmus braunii es un enzima adaptativo que se reprime por amonio tanto a la luz como en la oscuridad (Rigano, 1970). Su síntesis depende de la adición al

cultivo de una adecuada fuente de nitrógeno, siendo el nitrato la más efectiva. En ausencia de fuente de nitrógeno se forma una significativa cantidad de enzima (Syrett y Hipkin, 1973; Zumft et al., 1972) lo que indica que el nitrato no es un inductor esencial para la síntesis de novo del enzima. Por otra parte esta síntesis se inhibe por la adición de cicloheximida (Syrett y Hipkin, 1973).

La interconversión del enzima nitrato reductasa ha sido estudiada a fondo en nuestro laboratorio, a niveles celular, subcelular y molecular, empleando las algas verdes Chlorella fusca y Chlamydomonas reinhardtii (Losada, 1974; Losada 1976 a,b).

La adición de amonio a células de Chlorella fusca creciendo en la luz con nitrato, produce una rápida inactivación de la segunda mitad del complejo NADH-nitrato reductasa, i.e. FNH₂-nitrato reductasa, (Losada 1970). La subsiguiente eliminación del amonio del medio de cultivo lleva consigo la reactivación del enzima. Por otra parte el arseniato y la metilamina presentan un efecto semejante al observado con el amonio, cuando se añaden a un cultivo de células de Chlorella fusca

creciendo en la luz y CO_2 con nitrato como fuente de ni
trógeno (Losada, 1976 b). La característica común del a
monio, arseniato y metilamina, donde aparentemente se
encuentra la base de su acción inactivante, es que es-
tos tres compuestos son desacoplantes de la fotofosfori-
lación no cíclica (Good, 1960; Losada y Arnon, 1963).

In vitro, la inactivación de la mitad terminal
del complejo NADH-nitrato reductasa requiere piridín nu-
cleótidos reducidos (Moreno et al., 1972) y es potencia-
da por ADP (Maldonado et al., 1973). El enzima inactiva-
do in vivo o in vitro puede en todos los casos reactivarse in vitro por oxidación a 0°C con ferricianuro (Lo-
sada, 1976 b). El nitrato podría ser el sustituto fisiolo-
gico del ferricianuro, que actuara in vivo como agente
reactivante del enzima pero no se han conseguido resul-
tados concluyentes al respecto.

Aparentemente el amonio (y también la metilami-
na), actuando como desacoplantes de la fotofosforilación
no cíclica, origina un incremento en el nivel celular de
los piridín nucleótidos reducidos (Chaparro et al. 1976)
y de los nucleótidos descargados de adenina que producen
la inactivación de la nitrato reductasa. Esta hipótesis

se ha confirmado recientemente por estudios en los que el amonio y otros desacoplantes inhiben la reducción fotosintética de nitrato por partículas del alga verde azulada Nostoc muscorum (Ortega et al., 1977).

Por otro lado el grupo de Vennesland en Berlin ha propuesto un sistema de regulación metabólica para la NADH-nitrato reductasa de Chlorella vulgaris basado en la inactivación reversible por cianuro del enzima reducido (Lorimer et al., 1974). La inactivación in vivo del enzima de Chlorella vulgaris tiene también lugar por la adición de amonio a células creciendo en la luz con nitrato (Pistorius et al., 1976). La formación de cianuro en células de Chlorella vulgaris no ha sido relacionada de una forma concluyente con la adición de amonio al medio de cultivo. La histidina (Gewitz et al., 1976) y también la oxima del ácido glioxílico (Solomonson et al., 1977) han sido indicados como posibles precursores del cianuro en Chlorella vulgaris.

Es interesante señalar que Vega et al., (1972) mostraron que el cianuro, a bajas concentraciones, inactivaba in vitro eficazmente a la mitad terminal del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca, cuando

el enzima se encuentra reducido por NADH, su donador fisiológico de electrones. La inhibición no se elimina al dializar la preparación tratada. Sin embargo, la actividad original de la nitrato reductasa se recupera casi completamente y de forma instantánea al oxidar el enzima inactivo con ferricianuro.

En base a estas hipótesis discrepantes nos hemos planteado un estudio a fondo acerca del mecanismo de regulación in vivo e in vitro de la nitrato reductasa del alga verde Ankistrodesmus braunii. Los resultados que se presentan en este trabajo suponen una importante contribución al conocimiento del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii, tanto en lo que respecta a su composición como a su mecanismo de regulación, girando alrededor de los siguientes puntos :

a) La puesta a punto de un método de purificación que permite obtener cantidades significativas de enzima de gran calidad en lo que se refiere a su actividad específica y pureza.

b) La caracterización del grupo hemo componente de la nitrato reductasa de A. braunii.

c) El estudio del mecanismo de regulación del enzima tanto a nivel de síntesis como de actividad, y en este último caso in vivo e in vitro, prestando especial atención al efecto del ADP como potenciador de la inactivación.

Parte de este trabajo ha sido ya publicado en revistas (Diez et al., 1977) o se ha presentado en forma de resumen en Congresos Científicos (Diez et al., 1977).

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. CULTIVO DE CELULAS

II.1.1. *Organismo empleado y condiciones standard de cultivo*

El material biológico utilizado en el presente trabajo ha sido el alga verde Ankistrodesmus braunii 202-7c, procedente de la colección de cultivos de la Universidad de Göttingen (Alemania).

El medio de cultivo era esencialmente igual al descrito previamente por Kessler et al. (1963), excepto que se usó NO_3K 8 mM como fuente de nitrógeno y unas gotas de silicona como agente antiespumante. Este medio se utilizó generalmente sin esterilizar ya que, la ausencia de compuestos carbonados y la gran masa de células de Ankistrodesmus que se usó como inóculo hacían que la contaminación fuese mínima, como se pudo comprobar por examen microscópico del cultivo.

Las células se cultivaron a la luz a 25°C en tubos de 250 ml o en botellas de 1 l según las necesidades, por los que se hacía pasar una corriente de aire conteniendo un 5% (v/v) de CO_2 . En los casos en que se llevó a cabo la purificación del enzima fué necesario obtener una mayor

masa de células, para lo cual el alga se cultivó en botellas de 20 l de capacidad. La iluminación se realizó con tubos fluorescentes de luz blanca que proporcionaban 1.200 lux en la superficie del recipiente de cultivo.

En los experimentos de regulación in vivo las células se dejaron crecer en las condiciones anteriores hasta la fase exponencial de crecimiento ($A_{660 \text{ nm}} = 1,5-2$) y, posteriormente se sometieron a los tratamientos indicados en cada caso.

Para la preparación del inóculo se partió de células cultivadas en agar, o bien de las procedentes de anteriores cultivos en medio líquido.

II.1.2. *Condiciones especiales de cultivo*

El cultivo en la oscuridad se realizó colocando los tubos en unos cilindros de cartón totalmente cubiertos por papel de aluminio.

En aquellos experimentos en que se suprimió la aireación, el medio se gaseó previamente con argón durante 2 h, luego se añadieron las células y los cultivos se ga-

searon, durante el tratamiento posterior, con una corriente de argon que contenfa CO₂ al 5% (v/v).

II.2. ENZIMAS

II.2.1. *Preparación de extractos crudos*

II.2.1.1. Recogida de células

Las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento por centrifugación a 13.000 x g durante 5 min. Posteriormente se resuspendieron en agua destilada y a continuación se sometieron a una nueva centrifugación a 27.000 x g durante 10 min con objeto de eliminar los restos del medio de cultivo.

Por cada 250 ml de cultivo se obtuvieron de 0,8 a 1 g de peso fresco de células.

II.2.1.2. Rotura de células

Las células recogidas se mezclaron con perlas de vidrio de 0,25-0,30 mm ϕ y una solución de Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5, 10 μ M en FAD. Por cada 10 g de células se añadieron 50 ml de perlas y 8 ml de tampón. Una vez preparada, la pas

ta homogénea se sometió a vibración a alta velocidad durante 4 min a 0°C. La preparación de células rotas se lavó después con el tampón anteriormente indicado (50 ml por cada 10 g de células).

El homogenado se decantó y se centrifugó a 27.000 x g durante 15 min, el sobrenadante constituyó el extracto crudo libre de células a partir del cual se purificó la nitrato reductasa o se ensayaron las actividades enzimáticas.

Cuando se partió de una pequeña cantidad de células (inferior a 3 g de peso fresco), éstas se rompieron en un mortero con alúmina en la proporción aproximada de 3 g de alúmina por cada g de células. El material roto se extrajo con tampón Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5 en la proporción de 8 ml de tampón por cada g de peso fresco de células. El sobrenadante constituyó el extracto crudo para la determinación de las actividades enzimáticas.

Todas las operaciones descritas se realizaron a una temperatura entre 0 y 4°C.

II.2.2. *Purificación parcial de la nitrato reductasa de A. braunii*

La nitrato reductasa se purificó a partir de los extractos crudos libres de células, según el método descrito previamente para Chlorella (Aparicio, 1971; Moreno, 1973), con algunas variantes. La purificación se realizó a baja temperatura (4°C) e incluía los siguientes pasos :

a) Tratamiento con sulfato de estreptomicina.-

Por cada 10 ml de extracto crudo se añadió lentamente y con agitación continua, 1 ml de una solución de sulfato de estreptomicina (73 mg/ml) ajustada a pH 7,0 con NaOH 1 M. La preparación se mantuvo a 0°C durante 10 min con agitación ocasional, después se centrifugó a 27.000 x g durante 15 min y se recogió el sobrenadante.

b) Adsorción en gel de fosfato cálcico.- Por cada 5 ml del sobrenadante anterior se añadió gota a gota y con agitación ocasional, 2 ml de gel de fosfato cálcico de 10 mg/ml, preparado como describe Wood (1955). Después de 10 min, la mezcla se centrifugó a 4.500 x g durante 5 min desechándose el sobrenadante.

El precipitado obtenido se resuspendió en pirofos

fato sódico 0,1 M (pH 7,0), 10 μ M en FAD, añadiendo poco a poco un volumen igual al de gel de fosfato utilizado. La suspensión se mantuvo a 0°C durante 20 min y se centrifugó a 39.000 x g durante 15 min, recogiendo el sobrenadante.

c) Precipitación con sulfato amónico.- A continuación se añadió al sobrenadante obtenido en el paso anterior, sulfato amónico hasta alcanzar un 50% de saturación. La mezcla se mantuvo 15 min con agitación ocasional, y se centrifugó a 27.000 x g durante 15 min, resuspendiéndose luego el centrifugado en 1-2 ml de una disolución de tampón Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5, 10 μ M en FAD.

Con objeto de eliminar las sales de la preparación así obtenida, ésta se hizo pasar a través de una columna de Sephadex G-25 (18 x 80 mm) equilibrada con el tampón descrito anteriormente.

La preparación obtenida presentaba una actividad específica de aproximadamente 500 mU/mg, lo que suponía una purificación de 12 veces. Salvo que se indique otra cosa ésta es la nitrato reductasa parcialmente purificada que se ha utilizado en los estudios de interconversión in vitro.

II.2.3. *Determinación de actividades enzimáticas*

II.2.3.1. Actividad NAD(P)H-nitrato reductasa

Esta actividad se determinó por dos procedimientos. El primero consiste en seguir espectrofotométricamente la desaparición de NAD(P)H que acompaña estequiométricamente a la reducción de nitrato (Hageman et al., 1971). En cubetas de espectrofotómetro se prepararon las mezclas de reacción que contenían, además de la preparación enzimática, 100 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5, 10 μ moles de NO_3K y 0,15 μ moles de NAD(P)H en un volumen final de 1 ml. Se siguió primero la desaparición de NAD(P)H en ausencia de nitrato con el fin de detectar la presencia de alguna oxidasa inespecífica, hecho esto, se añadió el nitrato con lo que se iniciaba la reacción, que se siguió a temperatura ambiente.

El segundo procedimiento empleado consistía en medir colorimétricamente el nitrito aparecido como consecuencia de la reducción del nitrato (Panegue y Losada, 1966). La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo de 10 ml. La mezcla contenía además de la preparación enzimática, 100 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5, 10 μ moles de NO_3K y 0,3 μ moles de NAD(P)H en un volumen final de 1 ml. A los

10 min de incubación a 30°C, se detuvo la reacción por acidificación de la mezcla y se determinó el nitrito aparecido según se describirá posteriormente.

II.2.3.2. Actividad NAD(P)H-diaforasa

Se determinó siguiendo espectrofotométricamente el cambio de color que acompaña a la reducción del citocromo c (Aparicio et al., 1969). La mezcla de reacción contenía, además de la preparación enzimática, 200 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5, 0,12 μ moles de citocromo c y 0,3 μ moles de NAD(P)H en un volumen final de 2 ml. La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro a temperatura ambiente.

II.2.3.3. Actividades FMN₂ y MVH-nitrato reductasa

La segunda actividad parcial del complejo enzimático reductor del nitrato se determinó midiendo la aparición de nitrito procedente del nitrato en presencia de FMN o MV reducidos químicamente con ditionito (Panegue et al., 1965). La mezcla de reacción para la determinación de estas actividades incluía, en un volumen final de 1 ml, además de la preparación enzimática, 100 μ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5, 10 μ moles de NO₃K, 2 μ moles de FMN (ac-

tividad FMNH₂-nitrato reductasa) ó 1,5 μ moles de MV (actividad MVH-nitrato reductasa) y 0,1 ml de una solución que contenía 46 μ moles de S₂O₄Na₂ y 92 μ moles de CO₃HNa por ml. Al cabo de 10 min se detuvo la reacción mediante agitación vigorosa hasta que todo el ditionito quedó oxidado. Posteriormente se determinó el nitrito aparecido como se describe más adelante.

La unidad de actividad enzimática NAD(P)H-nitrato reductasa, NAD(P)H-diaforasa y FNH₂ o MVH-nitrato reductasa se define como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo, cataliza la oxidación de 1 μ mol de NAD(P)H o la reducción de 1 μ mol de citocromo c o la formación de 1 μ mol de nitrito por min respectivamente.

II.3. TECNICAS EXPERIMENTALES Y DETERMINACIONES ANALITICAS

II.3.1. *Medida del crecimiento*

El crecimiento celular se determinó midiendo la absorbancia a 660 nm en alícuotas del cultivo.

II.3.2. *Determinación de nitrato*

La concentración de nitrato se determinó espec-

trofotométricamente de acuerdo con el método de Cawse (1967). A 1 ml de medio de cultivo, tras eliminar las células por centrifugación a alta velocidad, se le añadió 1 ml de una solución de ácido sulfámico al 2% (p/v); tras dos min de preincubación a la temperatura ambiente, se le añadió 8 ml de ácido perclórico al 5% (p/v) y a la mezcla subsiguiente se le midió la absorbancia a 210 nm, estimandola contra un blanco preparado con el medio de cultivo sin nitrato y con los reactivos.

Para determinar el nitrato en las células, éstas se recogieron por centrifugación a alta velocidad y se lavaron dos veces con agua destilada. Se rompió 1 g (peso fresco) con alúmina en mortero, según se ha descrito anteriormente, y el material roto se resuspendió con 10 ml de ClH 1 M. Después de 5 min de incubación, la suspensión se centrifugó a $27.000 \times g$ durante 10 min y el nitrato se determinó usando 1 ml de sobrenadante, como se señaló anteriormente. Todas las operaciones se realizaron a la temperatura ambiente.

II.3.3. *Determinación de nitrito*

El nitrito se determinó por la reacción de diazotación de Griess-Ilosway, según el método de Snell y

Snell (1949).

A la alícuota en que se desea determinar la can tidad de nitrito se le añade 1 ml de reactivo de sulfanilamida al 1% (p/v) en ClH, 2,5 M y 1 ml de reactivo de N(-naftil)etilendiamina al 0,02% (p/v). La mezcla anterior se completa con agua hasta 5 ml y se deja desarrollar el color a temperatura ambiente antes de la lectura en el fotocolorímetro. Se empleó una recta de calibrado construída con cantidades crecientes de nitrito tratadas en las condiciones previamente descritas.

II.3.4. *Determinación de proteína*

Para la determinación de la cantidad de proteína se utilizaron el método de Lowry et al. (1951) y una modificación de éste realizada por Bailey (1967) usándose en ambos casos seroalbúmina como proteína patrón.

II.3.5. *Determinaciones espectrofotométricas*

Los coeficientes de extinción molar empleados fueron : para NADH y NADPH (340 nm) $6,2 \times 10^3$ y para el citocromo c reducido (550 nm) 28×10^3 .

Las medidas de absorbancia de los productos coloreados que se forman al determinar el nitrito o la proteína por el método de Lowry, se realizaron a 540 nm ó 500 nm respectivamente. Cuando se utilizó el método de Bailey se hicieron a 750 nm.

Los espectros de absorción se registraron en un espectrofotómetro, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz.

Todos los registros se realizaron a temperatura ambiente.

II.3.6. *Preparación de la Sefarosa-Azul Dextrano*

El procedimiento seguido fué análogo al descrito por Cuatrecasas (1970). 1 g de Sefarosa-4B activada con BrCN se lavó con 200 ml de agua destilada mediante filtración por vacío. La resina lavada fué inmediatamente suspendida en 7 ml de tampón $\text{CO}_3\text{H}^-/\text{CO}_3^-$ 0,4 M, pH 10,0, conteniendo 100 mg de Azul Dextrano. La suspensión se agitó lentamente durante 18 h a 4°C, y así tuvo lugar la reacción de acoplamiento del ligando a la matriz. A continuación se lavó varias veces con ClK 1 M para eliminar el Azul Dextrano

que no hubiera reaccionado, así como una solución de glicina para bloquear los grupos de la matriz que no acoplaron el Azul Dextrano.

Por último, la resina de Sefarosa-Azul Dextrano se empaquetó en una columna de 7,5 x 55 mm (para poner a punto los métodos de adsorción y elución) o en una columna de 17 x 65 mm (para purificar grandes cantidades de enzima).

II.3.7. *Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida*

Las separaciones analíticas se realizaron a 4°C en tubos (5 x 100 mm) utilizando el sistema discontinuo de gel de Jovin et al. (1964). Muestras conteniendo de 10 a 50 µg de proteína se aplicaron a geles de poliacrilamida al 5%, realizándose las electroforesis a 3 mA por gel durante dos o cuatro horas, y usando un tampón de pH 8,3 compuesto por Tris-ClH (6,0 g/l) y glicina (28,8 g/l). Cuando se quería determinar actividad nitrato reductasa en los geles, el tampón anterior se suplementaba con FAD 20 µM.

II.3.7.1. Tinción de proteína en el gel

Las proteínas se localizaron tiñendolas por in-

mersión de los correspondientes geles en una solución de Azul de Coomassie al 1% (p/v) en ácido acético al 7% (p/v). Posteriormente los geles se lavaron repetidamente con una solución de acético al 7% y metanol al 5%, permaneciendo teñidas en azul las bandas de proteína.

II.3.7.2. Ensayo de actividad nitrato reductasa en geles de electroforesis

La actividad nitrato reductasa se ensayó en los geles de electroforesis por un método básicamente semejante al utilizado por Vega y Kamin (1977) para la nitrito reductasa. Los geles se sumergieron en tampón Tris-ClH, 0,05 M, pH 7,5, conteniendo por ml 1 μmol de metil viológeno y 15 mg de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$. Al cabo de 10 min a temperatura ambiente, los geles presentaban el color azul del metil viológeno reducido. Entonces se transfirieron a tubos de ensayo que contenían una solución de NO_3K 100 μM en Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5. La actividad nitrato reductasa se mostraba por una banda incolora que aparecía al cabo de unos minutos en el gel, debido a la oxidación catalítica de metil viológeno por nitrato. Los geles se transferían rápidamente a una solución al 2,5% (p/v) de cloruro de trifeniltetrazolio que reacciona con el metil viológeno reducido produciendo un formazano insoluble. La actividad nitrato reductasa se mos-

traba entonces como una banda incolora en geles de color rojo.

II.3.7.3. Tinción del hemo en geles de electroforesis

La tinción del hemo en geles de electroforesis se hizo por el método de Connelly con ligeras variaciones de Solomonson et al. (1975). Los geles se sumergieron en una solución recién preparada de la siguiente forma : A 25 ml de metanol se le añade 1 g de bencidina, una vez disuelta ésta, se adicionan 10 ml de agua destilada, 5 ml de ácido acético glacial, 2,5 ml de H₂O₂ al 3% (p/v) y 0,5 ml de piridina. Al cabo de 30 min a temperatura ambiente el hemo se mostraba por la aparición de una banda de color parduzco en el gel, que en ese momento se colocaba en un tubo de ensayo que contenía una solución de ácido acético al 7% (p/v).

II.4. REACTIVOS Y APARATOS

II.4.1. *Procedencia de los reactivos empleados*

Los piridín nucleótidos, flavín nucleótidos, adenín nucleótidos, Tris, EDTA, Azul Dextrano y Azul de Coomassie se adquirieron a SIGMA, St. Louis, U.S.A. El ferricianuro potásico, sulfato amónico, clorhidrato de metilamina

y peróxido de hidrógeno se obtuvieron de MERCK, Darmsdat, Alemania. La Sefarosa-4B activada y el Sephadex G-25 de Pharmacia, Upsala, Suecia y el sulfato de estreptomicina de la Cia. Española de Penicilina.

Para la rotura de células se empleó perlas de vidrio de B. BRAUN, Melsungen, Apparatebau, Alemania; o bien alúmina de grado bacteriológico de ALCOA, Arkansas, U.S.A. El resto de los productos empleados se adquirieron a las firmas SIGMA, SERVA, MERCK y CARLO ERBA, siendo todos ellos de grado analítico.

El CO₂ empleado en el cultivo de las células fué suministrado por Coromina Industrial, Sevilla.

En la preparación de las disoluciones y medios de cultivo, así como para lavar el material de laboratorio se utilizó agua destilada.

II.4.2. Aparatos utilizados

La rotura de células por vibración se realizó en un aparato Bühler modelo Vi 2.

Para las centrifugaciones se empleó una centri-

fuga Sorvall RC2-B refrigerada.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en modelos PYE-UNICAM SP 1800 y 1750 con registro automático. Las medidas colorímetricas en la zona visible se hicieron empleando un fotocolorímetro Spectronic 700 de la casa Bausch and Lomb.

Para la medida del pH se utilizó un aparato de escala expandida Methrom-Harrison, modelo E-152. El flujo de la columna de Sefarosa-Azul Dextrano fué controlado mediante una bomba peristáltica del tipo LKB.

Las electroforesis en gel de poliacrilamida se realizaron con un aparato analítico Shandon, tipo 2541. El agua destilada ~~se obtuvo con un destilador~~ D.R.A.

Cuando fué necesaria una agitación vigorosa de las preparaciones, se empleó un vibrador de alta velocidad, Super Mixer, suministrado por Lab-Line Instruments, U.S.A. El aire empleado en el cultivo de células en medio líquido fué impulsado por una bomba de membrana Reciprotor.

III. RESULTADOS

III.1. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD CON SEFAROSA-AZUL DEXTRANO DE LA NITRATO REDUCTASA DE A.braunii

III.1.1. *Condiciones óptimas de adsorción del enzima a la Sefarosa*

La Fig. 1 muestra que la nitrato reductasa de A. braunii se une mejor a la Sefarosa-Azul Dextrano a pH 6,5-7,0. A pH 7,5, un 30% aproximadamente de la actividad total no se adsorbe, mientras que si la operación se realiza a pH 8,0 o superior, no queda retenida la nitrato reductasa en la columna. Según estos datos se ha elegido 7 como pH de trabajo durante este tratamiento.

Respecto a la naturaleza del tampón a utilizar se ha escogido el fosfato, ya que presenta por un lado, un alto poder amortiguador de pH en la zona próxima a 7, y por otro, ventajas muy significativas con respecto a otros compuestos ensayados. Hemos usado tampón de fosfato y Tris-ClH en condiciones semejantes de pH y fuerza iónica y se ha podido comprobar que la adsorción de la nitrato reductasa a la Sefarosa-Azul Dextrano es sensiblemente mejor cuando se utilizó fosfato.

El FAD es un efectivo protector de la actividad

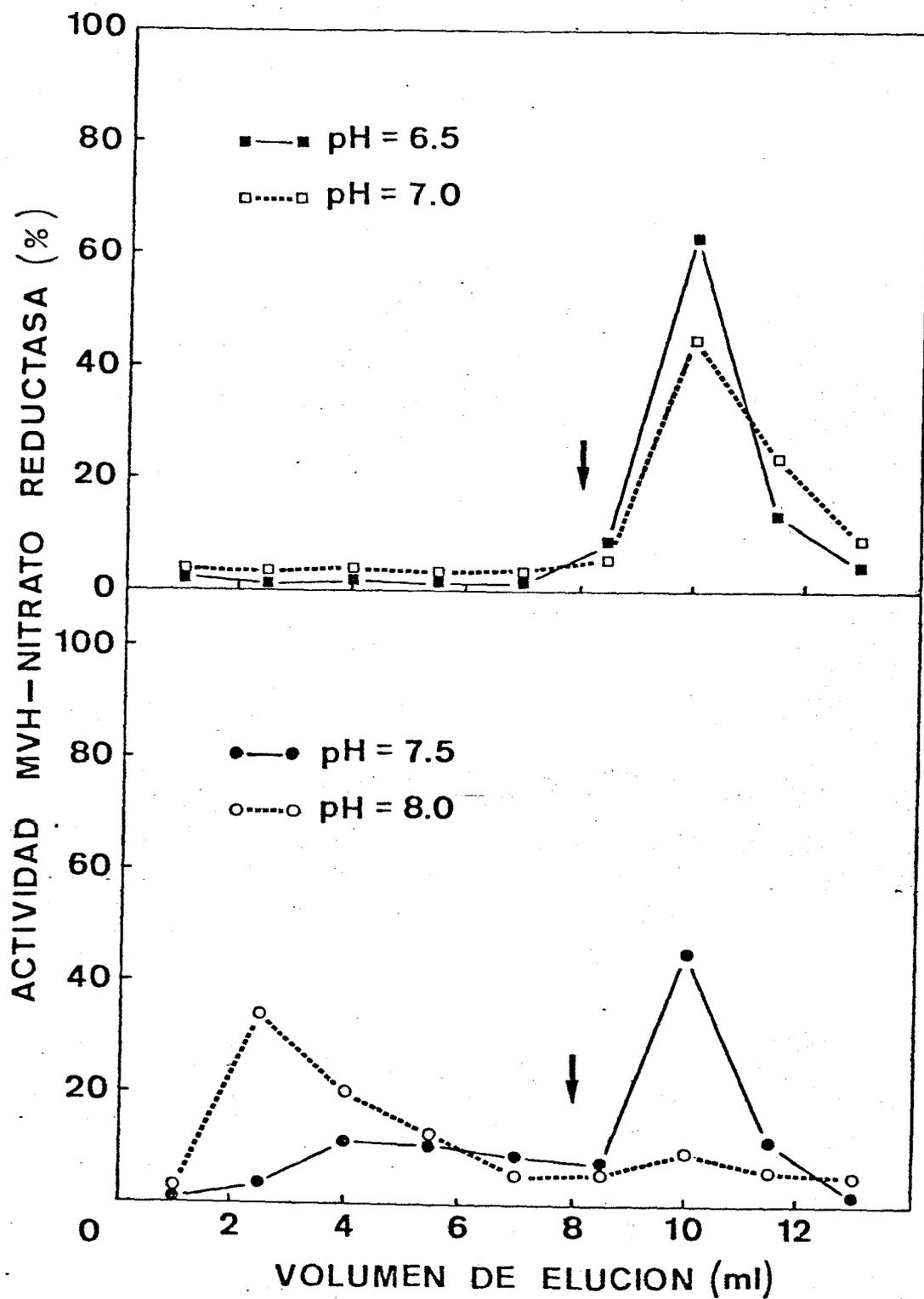


Fig. 1. *Efecto del pH sobre la adsorción de la nitrato reductasa a la Sefarosa-Azul Dextrano.* - Cuatro preparaciones de nitrato reductasa parcialmente purificadas y en tampón fosfato 10 mM, DTE, 0,15 mM; EDTA, 0,10 mM; del pH que se indica en la figura, se hicieron pasar respectivamente por una columna de Sefarosa-Azul Dextrano. A continuación se lavó en cada caso con el tampón anterior del pH correspondiente, y por último la nitrato reductasa que quedó adsorbida en cada columna se eluyó con una solución de ClK 3 M en dicho tampón.

La actividad nitrato reductasa de cada fracción está expresada en tanto por ciento, considerando el 100% de actividad la suma de las actividades de todas las fracciones recolectadas en cada caso.

La flecha indica el momento en que se aplicó la solución de ClK.

diaforasa del complejo enzimático nitrato reductasa de algas verdes (Zumft et al., 1970). El DTE protege los grupos -SH de la proteína y el EDTA protege al enzima contra la acción desnaturizante de metales. Hemos incluido estos compuestos en este estudio con objeto de minimizar las pérdidas de la actividad nitrato reductasa durante la adsorción a la Sefarosa-Azul Dextrano. En conclusión el tampón utilizado fué principalmente fosfato sódico, 10 mM, pH 7,0, conteniendo DTE, 0,15 mM, EDTA, 0,10 mM y FAD 20 μ M (Tampón A). También se usó en algunos experimentos este tampón pero sin incluir el FAD (Tampón B).

III.1.2. *Elución del enzima*

Una vez adsorbida la nitrato reductasa a la columna de Sefarosa-Azul Dextrano se procede a lavar con 10 ml de tampón B (un volumen 10 veces superior al volumen de exclusión de la columna) saliendo gran cantidad de proteína sin actividad nitrato reductasa, la cual se eluye posteriormente al incrementar la fuerza iónica del tampón de lavado por adición de ClK hasta una concentración final de 3 M como se observa en la Fig. 2.

La desestabilización de la unión de la nitrato reductasa a la Sefarosa-Azul Dextrano, y por tanto la elu-

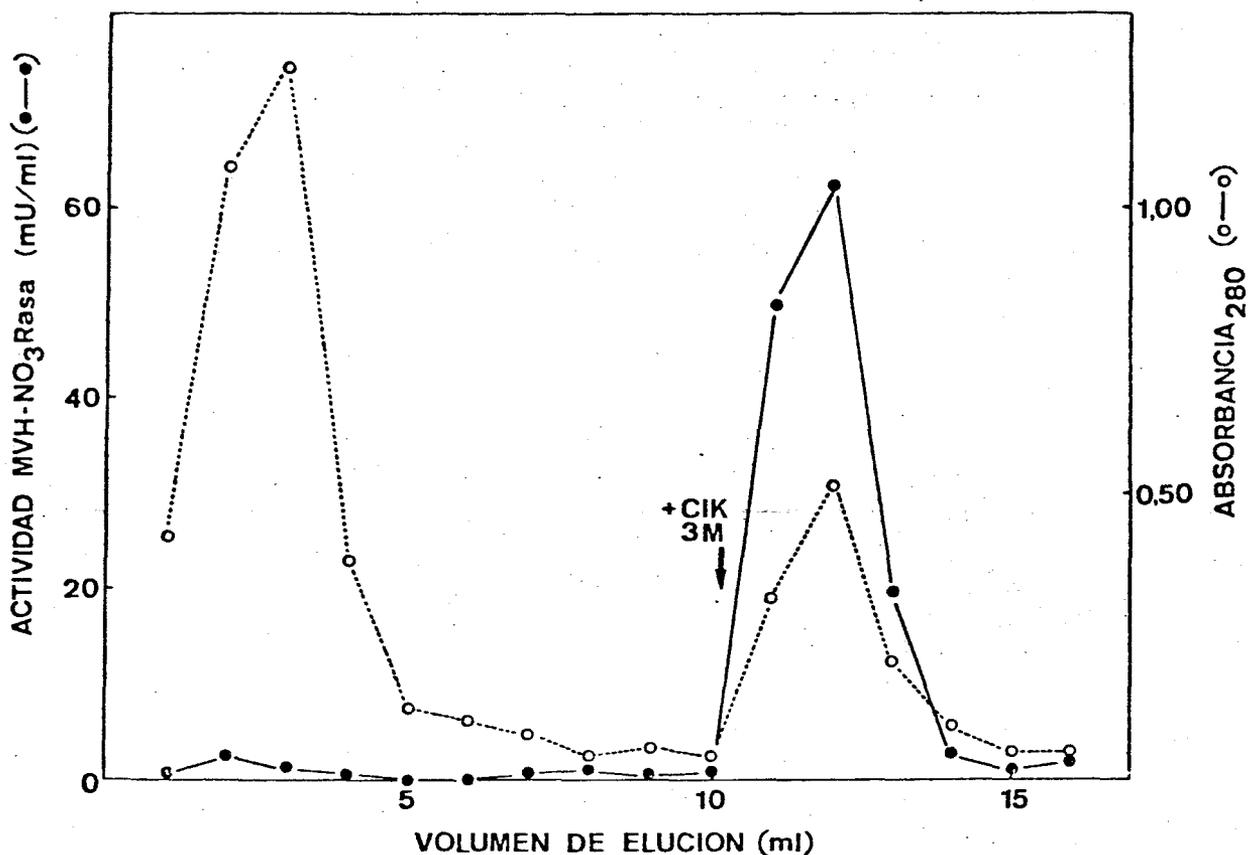


Fig. 2. Perfil de elución de proteína y actividad nitrato reductasa adsorbida en una columna de Sefarosa-Azul Dextrano.- Una solución de nitrato reductasa parcialmente purificada se pasó por una columna de Sefarosa-Azul Dextrano en condiciones óptimas de adsorción. La columna se lavó con tampón fosfato 10 mM, pH 7,0; DTE, 0,15 mM, EDTA, 0,10 mM, y donde indica la flecha, dicho tampón, se suplementó con ClK hasta una concentración 3 M.

Se recogieron fracciones de 1 ml y se determinó la proteína según su absorción a 280 nm, y la actividad MVH-nitrato reductasa (ver Métodos).

El resto de las condiciones experimentales se detallan en Resultados.

ción del enzima, puede conseguirse de una forma más específica por la acción combinada de NADH, sustrato fisiológico del enzima, más FAD, que es uno de sus grupos prostéticos. Los resultados de la Fig. 3 indican que cuando el tampón B se suplementa con NADH, 0,5 mM, más FAD, 20 μ M, se consigue la elución de la nitrato reductasa. Ninguno de estos nucleótidos por separado y a las concentraciones indicadas son eficaces para producir la elución del enzima.

La Fig. 4 muestra que la actividad nitrato reductasa, eluída con NADH más FAD, coincide con un pico de proteína. La posterior adición de ClK, 3 M, más FAD eluye el resto del enzima pero con una actividad muy baja, ya que la cantidad de proteína total que sale en este caso es mayor que cuando se utilizan los nucleótidos como eluyentes. Esto indica que la elución con nucleótidos es prácticamente específica para la nitrato reductasa, mientras que cuando se eluye con fuerza iónica salen además otras proteínas contaminantes.

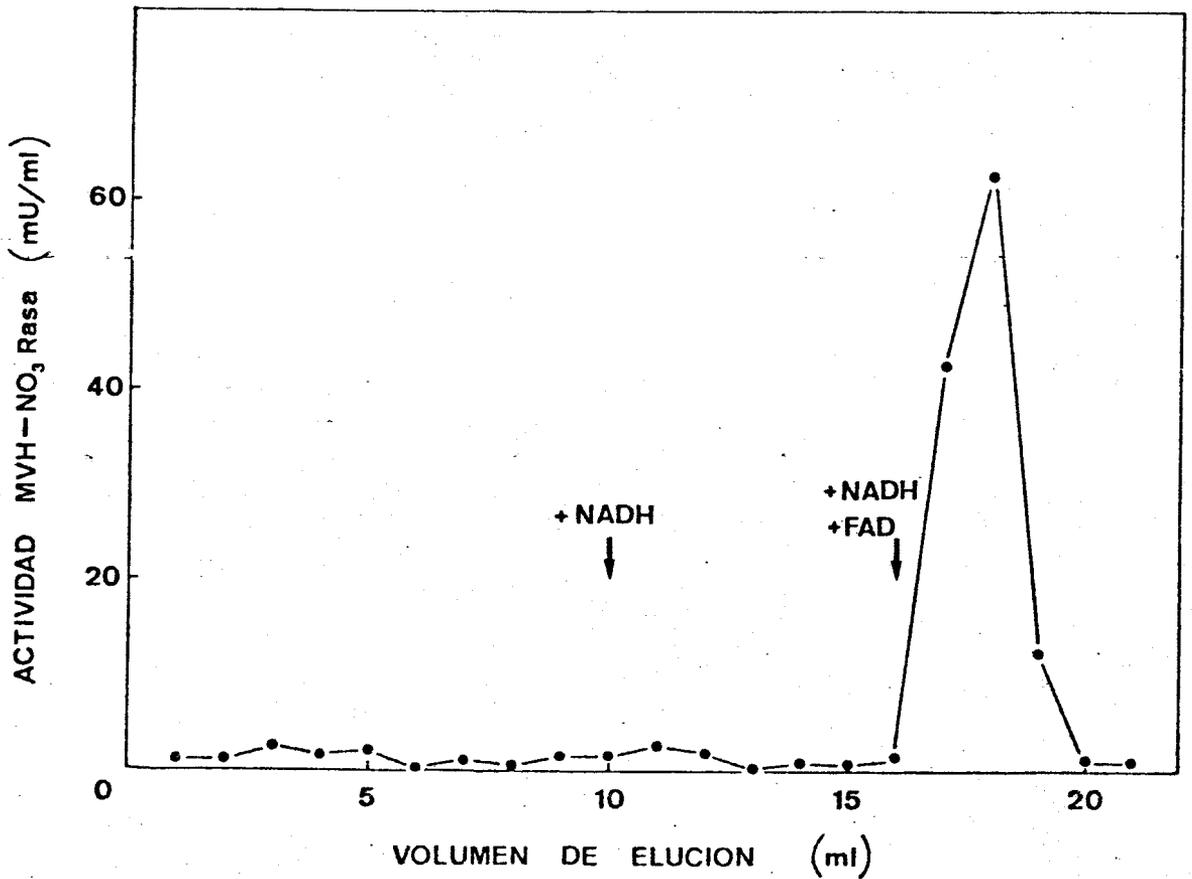


Fig. 3. Perfil de elución con NADH más FAD, de la nitrato reductasa de *A. braunii* adsorbida en una columna de Sefarosa-Azul Dextrano.- Cuando se indica se aplicó a la columna una solución de NADH 0,5 mM en tampón fosfato, 10 mM, pH 7,0; DTE, 0,15 mM; EDTA, 0,10 mM, bien solo o suplementado con FAD 20 μ M.

La actividad MVH-nitrato reductasa se ensayó utilizando alícuotas de las fracciones recogidas.

Para más detalles ver Resultados.

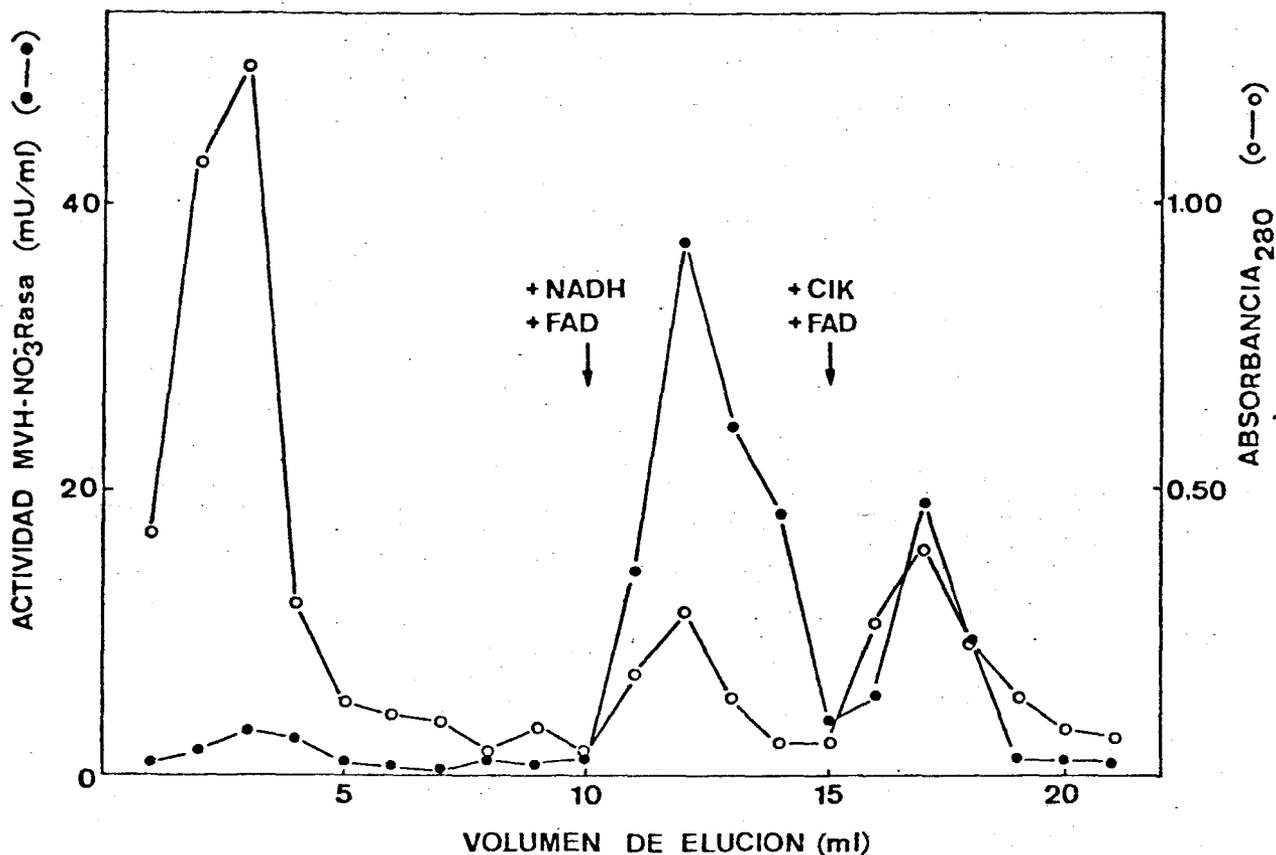


Fig. 4. Perfil de elución con NADH o ClK, en presencia de FAD, de la nitrato reductasa de *A. braunii* adsorbida a una columna de Sefarosa-Azul Dextrano. — Después de pasar la preparación enzimática por una columna de Sefarosa-Azul Dextrano, dicha columna se lavó con tampón A (FAD 20 μ M). Cuando se indica se adicionó al tampón de lavado NADH 0,5 mM o ClK hasta concentración 3 M.

Se recogieron fracciones de 1 ml donde se midió la proteína por la absorbancia a 280 nm, y las actividades MVH-nitrato reductasa (ver Métodos).

III.2. PURIFICACION HASTA HOMOGENEIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA DE A. braunii

III.2.1. *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 indica en Materiales y Métodos, excepto que el tampón utilizado para extraer del material biológico las proteínas solubles fué fosfato sódico, 10 mM, pH 7,0, que contenía DTE, 0,15 mM, EDTA, 0,10 mM y FAD, 20 μ M (Tampón A).

Tratamiento con sulfato de estreptomicina. - Al extracto crudo se añadió, gota a gota y con agitación continua, una solución 0,1 M de sulfato de estreptomicina, en la proporción de 1 ml por cada 10 ml de extracto. Después de 10 min a 0°C y con agitación ocasional, la suspensión se centrifugó a 20.000 x g durante 10 min y se recogió el sobrenadante.

Cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano. - El sobrenadante anterior se pasó a través de una columna empaquetada con Sefarosa-Azul Dextrano (17 x 65 mm) previamente equilibrada con tampón A. La columna se lavó

con 125 ml de tampón A, y posteriormente con 125 ml de tampón A conteniendo ClK 0,1 M. La nitrato reductasa se eluyó con NADH, 1 mM en tampón A, a una velocidad de flujo de 60 ml/h. Se recogieron fracciones de 3 ml y la nitrato reductasa salía de la columna con un pico de proteína.

El procedimiento de purificación resumido en la Tabla I, produce 0,42 mg de nitrato reductasa a partir de 30 g (peso fresco) de células de A. braunii, con una purificación de aproximadamente 1.200 veces, una actividad específica de 48,87 U/mg de proteína y una recuperación del 70%. Si se toma como referencia la fracción pico del perfil de elución de la nitrato reductasa, tenemos un enzima que representa una purificación de 1.500 veces aproximadamente, con una recuperación del 40% y una actividad específica de 61,25 U/mg de proteína.

III.2.2. *Pureza del enzima y separación de isoenzimas*

Después de someter la nitrato reductasa purificada a una electroforesis analítica en gel del 5% de poliacrilamida y pH 8,3, se obtuvieron dos bandas de proteína (Fig. 5). Con objeto de ver cual era la nitrato reductasa se procedió a determinar esta actividad en el gel de electroforesis (ver Materiales y Métodos) resultando que ambas

TABLA I

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

Fracción	Volumen	Proteína	Actividad total	Recuperación	Actividad específica	Factor de purificación
	ml	mg	Unidades	(%)	U/mg	
I. Extracto crudo	150	712	29,19	100	0,04	1
II. Sobrenadante de Estreptomicina	145	391	33,28	114	0,08	2
III. Eluato de Sefarosa-Azul Dextrano	24	0,42	20,43	70	48,87	1.192
Pico	6	0,19	11,68	40	61,25	1,494

La actividad NADH-nitrato reductasa se ensayó según se indica en Materiales y Métodos.

El procedimiento de purificación está detallado en Resultados.

TABLA I (continuación)

Fracción	MVH-nitrato reductasa		NADH-citocromo <u>c</u> reductasa	
	Actividad total	Actividad específica	Actividad total	Actividad específica
	Unidades	U/mg	Unidades	U/mg
I. Extracto crudo	32,75	0,05	155,22	0,22
II. Sobrenadante de Estreptomicina	35,70	0,09	147,45	0,38
III. Eluato de Sefarosa-Azul Dextrano	22,60	53,96	79,19	189,44
Pico	12,44	65,64	44,24	230,21

Las actividades enzimáticas se ensayaron según se indica en Materiales y Métodos.

El procedimiento de purificación está detallado en Resultados.

Proteína Actividad Hemo

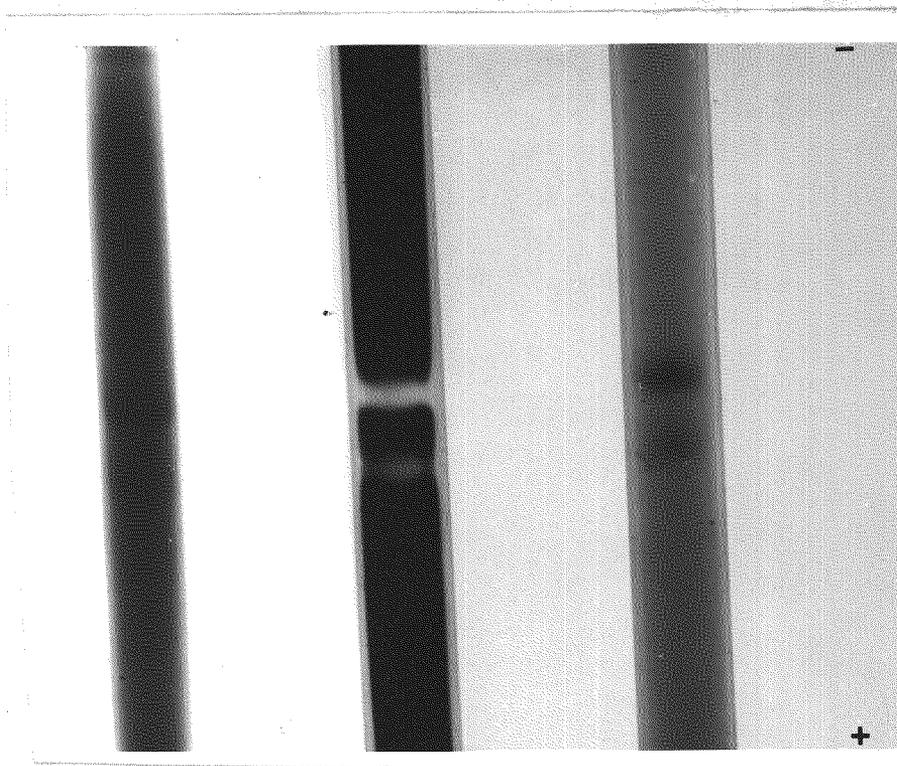


Fig. 5. *Electroforesis analítica de la nitrato reductasa de A. braunii en gel de poliacrilamida.*— Electroforesis de 20 μ g de proteína en gel de poliacrilamida (5%) durante 4 h. Para detalles acerca del proceso electroforético y métodos de tinción ver Materiales y Métodos.

proteínas presentaban actividad catalítica para reducir nitrato, y además las dos bandas eran hemoproteínas (Fig. 5) por lo que aparentemente se trata de dos formas moleculares de nitrato reductasa, o isoenzimas, que presentaban distinta movilidad electroforética. A la proteína que representa la banda de más lenta movilidad, la hemos llamado nitrato reductasa L y a la otra, de mayor movilidad, nitrato reductasa R.

III.2.3. *Especificidad de los isoenzimas nitrato reductasa de A. braunii por piridín nucleótidos reducidos*

Un análisis posterior de las actividades nitrato reductasa de estos dos isoenzimas indica que presentan distinta especificidad por el piridín nucleótido que dona los electrones para la reducción catalítica del nitrato. Los resultados de la Tabla II muestran que la nitrato reductasa L es prácticamente específica para NADH como donador de electrones ($\frac{\text{NADH-NO}_3 \text{ Rasa}}{\text{NADPH-NO}_3 \text{ Rasa}} = 7,41$), mientras que la nitrato reductasa R utiliza indistintamente NADH o NADPH como donador de electrones ($\frac{\text{NADH-NO}_3 \text{ Rasa}}{\text{NADPH-NO}_3 \text{ Rasa}} = 1,68$).

TABLA II

ESPECIFICIDAD DE LOS ISOENZIMAS NITRATO REDUCTASA DE
A. braunii POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS

	Actividad (mU)	
	NADH-NO ₃ Rasa	NADPH-NO ₃ Rasa
Isoenzima L	12,6	1,7
Isoenzima R	5,9	3,5

Después de resolver la nitrato reductasa por electroforesis en gel de poliacrilamida, se cortaron los geles justo a la altura donde se encontraban las bandas de proteína con actividad nitrato reductasa. Se colocaron las rodajas respectivas en los tubos de ensayo correspondientes y se añadieron 0,5 ml de tampón Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5. El gel se trituró con una varilla y se esperó 10 min para que difundiera la proteína desde el gel a la solución. Posteriormente el contenido de cada tubo se suplementó con los reactivos de ensayo de las actividades NADH ó NADPH-nitrato reductasa, que se midieron según se ha indicado en Materiales y Métodos.

L, enzima de menor movilidad electroforética.
 R, enzima de mayor movilidad electroforética.

III.3. CARACTERIZACION DEL GRUPO HEMO COMPONENTE DE LA NITRATO REDUCTASA DE A. braunii

III.3.1. *Espectro de absorción de la nitrato reductasa de A. braunii*

La nitrato reductasa de A. braunii muestra un espectro de absorción (Fig. 6), con máximos a 280 nm (típico de proteína), 416 nm (Soret de hemoproteína) y un pronunciado hombro a 450 nm (característico de la presencia de flavina).

Cuando se reduce el enzima con NAD(P)H o ditionito, el espectro de absorción en el visible es característico de la presencia de un hemo reducido (Fig. 7), observándose un desplazamiento de la banda Soret desde 416 a 424 nm, que va acompañado de un incremento en la absorbancia. Por otra parte el hombro a 450 nm se atenúa significativamente y aparecen dos nuevos máximos de absorción a 527 (banda β) y 557 (banda α) nm. Esto indica la presencia de un citocromo, probablemente del tipo b, y flavina (hombro a 450 nm) como grupos prostéticos de la nitrato reductasa de A. braunii.

Cuando el enzima reducido se reoxidaba con aire,

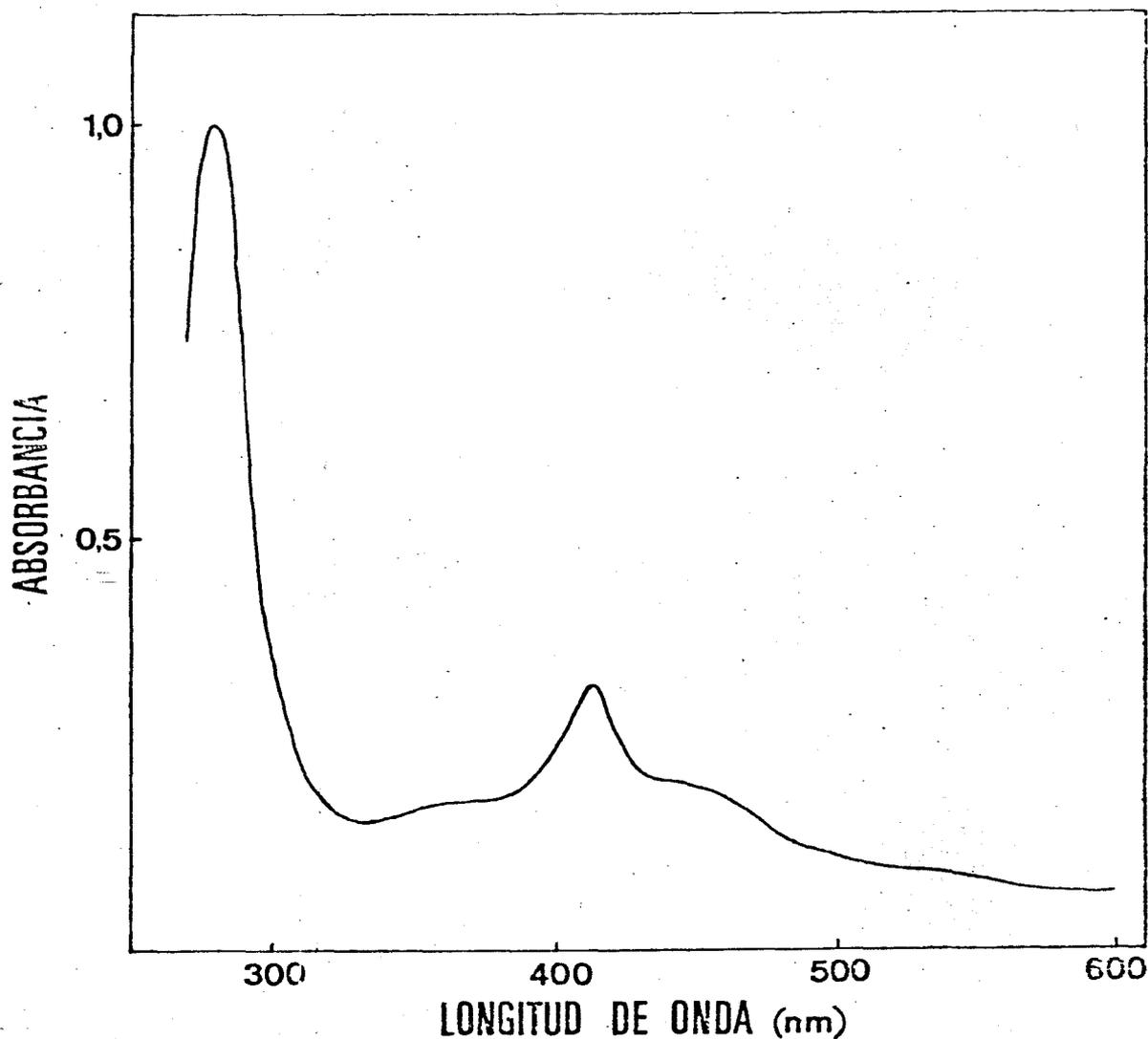


Fig. 6. Espectro de absorción de la nitrato reductasa de *A. braunii*.— El espectro del enzima oxidado se realizó utilizando una preparación enzimática (0,33 mg proteína/ml) en tampón fosfato 10 mM, pH 7,0; DTE, 0,15 mM; EDTA, 0,10 mM, contra un blanco de referencia que contenía dicho tampón.

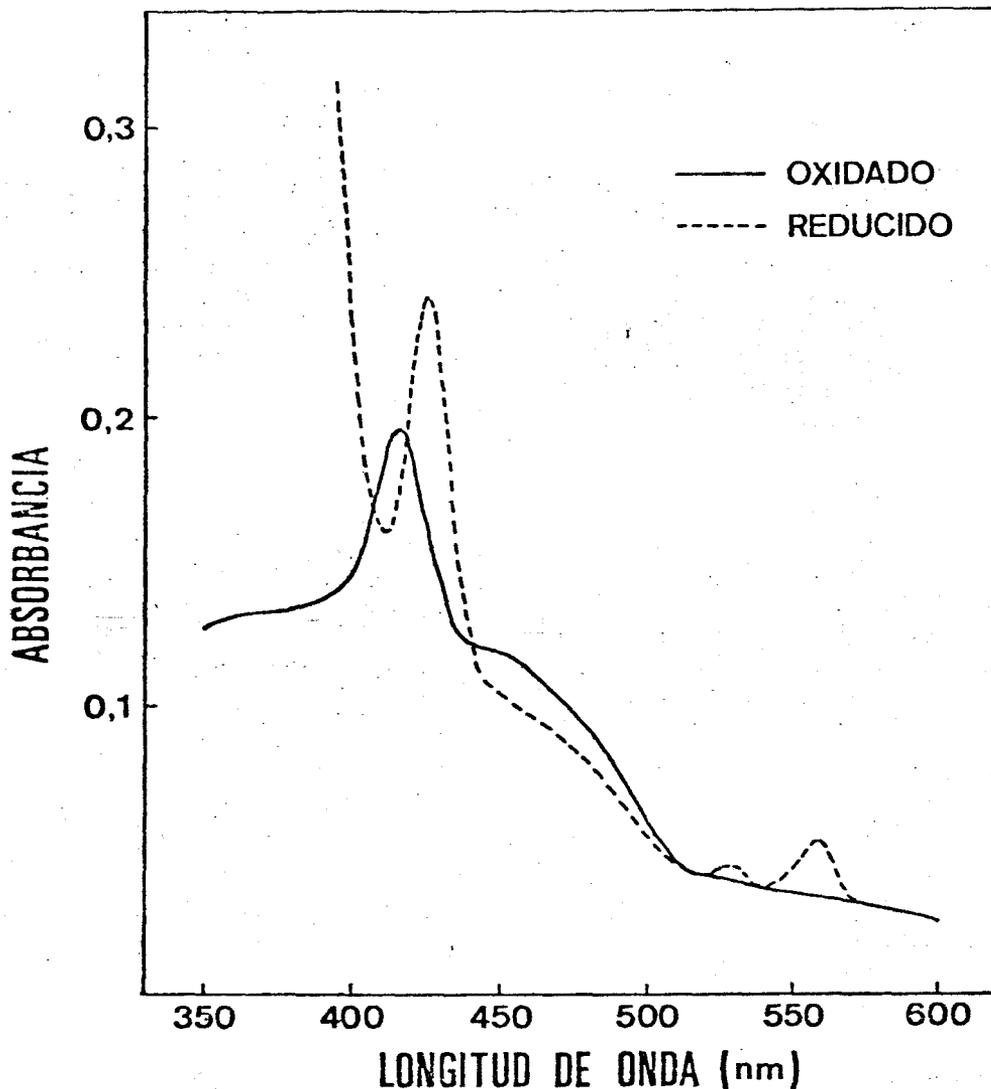


Fig. 7. Espectro de absorción en el visible de la nitrato reductasa purificada de *A. braunii*.— En todos los casos tenemos el enzima (0,33 mg proteína/ml) en tampón fosfato 10 mM, pH, 7,0; DTE, 0,15 mM; EDTA, 0,10 mM.

El espectro del enzima reducido era el mismo, independientemente de que se añadieran a la cubeta que contenía el enzima nativo, unos cristales de NADH, NADPH o ditionito sódico. En todos los casos el espectro de absorción se registraba inmediatamente después de la adición del reductor.

o bien con nitrato se recuperaban las características espectrales del enzima original oxidado, descritas anteriormente, lo que indica que el nitrato, sustrato fisiológico de la proteína, oxida perfectamente al citocromo y a la flavina de la nitrato reductasa de A. braunii.

III.3.2. *Espectro de absorción del derivado piridín-hemocromógeno de la nitrato reductasa de A. braunii*

Una importante información acerca de la naturaleza del grupo prostético hemo de la nitrato reductasa nos la da las características espectrales de su derivado hemocromógeno en piridina. La Fig. 8 muestra el espectro de absorción de este derivado, reducido con ditionito sódico, que presenta máximos de absorción a 414 (Soret), 522 (β) y 551 (α) nm indicativos de un citocromo de tipo b.

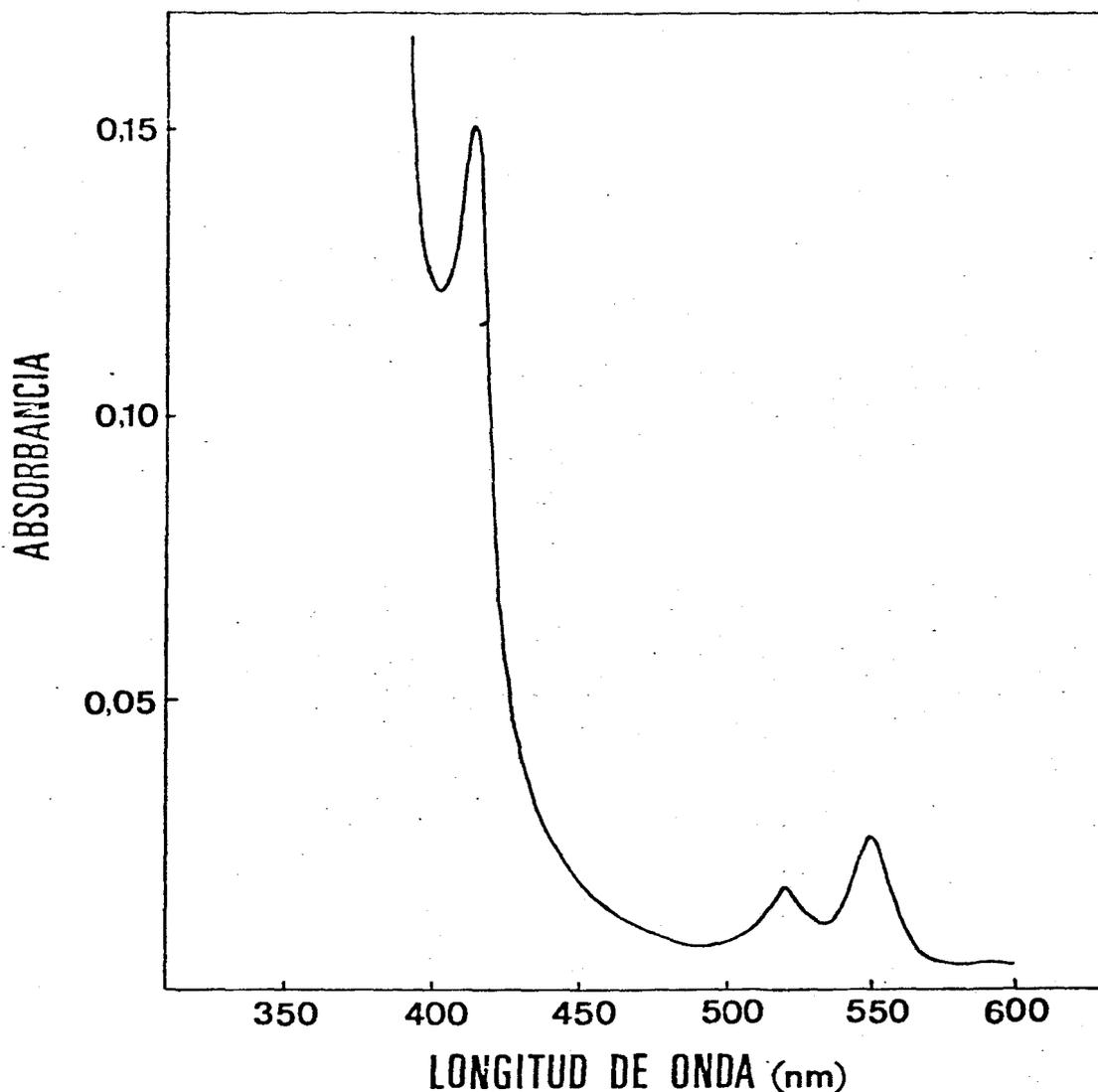


Fig. 8. Espectro de absorción del derivado hemocromógeno de la nitrato reductasa de *A. braunii* en piridina. - Se trató una fracción enzimática de 0,5 ml (0,16 mg proteína/ml) con 0,2 ml de piridina, seguido de la adición de 0,3 ml de KOH 0,2 N. A continuación se añadieron algunos cristales de ditionito sódico para conseguir la forma reducida del piridín hemocromógeno.

El espectro se realizó frente a un blanco de referencia que contenía 0,5 ml de tampón fosfato 10 mM, pH 7,0; DTE, 0,15 mM; EDTA, 0,10 mM; FAD 20 μ M; más 0,2 ml de piridina y 0,3 ml de KOH, 0,2 N.

III.4. REGULACION DEL COMPLEJO NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA DE A. braunii

III.4.1. *Regulación a nivel de síntesis de enzima*

Todas las actividades del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa de A. braunii, i.e. NAD(P)H-nitrato reductasa, MVH-nitrato reductasa y NAD(P)H-diaforasa, se reprimen nutricionalmente por amonio, producto final del sistema asimilatorio reductor de nitrato, o metilamina, compuesto no metabolizable por el alga (Tabla III). La represión de la síntesis del enzima por los compuestos mencionados se pone de manifiesto incluso en presencia de nitrato, lo que indica que la NAD(P)H-nitrato reductasa de A. braunii es, más bien un enzima reprimible por amonio o metilamina, que inducible por nitrato.

La síntesis de novo de la nitrato reductasa de A. braunii, que tiene lugar cuando el represor, amonio o metilamina, se elimina del medio de cultivo, depende de la adición de una adecuada fuente de nitrógeno. En ausencia de este elemento se sintetiza una significativa cantidad de enzima, sin embargo esta síntesis es más eficaz y rápida en presencia de nitrato (Tabla IV). Estos datos indican que el nitrato, que no es un inductor esencial

TABLA III

REPRESION POR AMONIO O METILAMINA DEL COMPLEJO NAD(P)H-NITRATO
 REDUCTASA DE A. braunii

Fuente de Nitrógeno	Actividades específicas relativas		
	NADH-NO ₃ Rasa ^a	MVH-NO ₃ Rasa	NADH-diaforasa ^a
NO ₃ ⁻	100	100	100
NH ₄ ⁺	7	7	15
NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	15	16	21
NO ₃ ⁻ + Metilamina	4	6	16

a) Resultados similares se obtuvieron cuando se usó NADPH en lugar de NADH como donador de electrones.

Células cultivadas en nitrato, como se indica en Métodos, se recogieron, se lavaron con medio de cultivo y se resuspendieron en nuevos medios en presencia de las fuentes de nitrógeno indicadas. Nitrato, 8 mM; amonio, 8 mM; metilamina, 15 mM. Tras 18 h de tratamiento se determinaron las actividades específicas de los correspondientes extractos crudos.

Las actividades específicas al 100% para la NADH-NO₃Rasa, MVH-NO₃Rasa y NADH-diaforasa fueron respectivamente 85, 75 y 255 mU/mg proteína.

TABLA IV

DERREPRESION DEL COMPLEJO NAD(P)H-NITRATO REDUCTASA DE

A. braunii

Fuente de Nitrógeno	Actividades específicas relativas		
	NADH-NO ₃ Rasa ^a	MVH-NO ₃ Rasa	NADH-diaforasa ^a
NH ₄ ⁺	3	3	9
NO ₃ ⁻	100	100	100
NO ₂ ⁻	12	12	30
Arg	15	20	30
Asp	28	27	40
Ninguna	54	55	73

a) Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó NADPH en lugar de NADH como donador de electrones.

Células cultivadas en amonio 16 mM, durante 18 h se recogieron, se lavaron y se pasaron a nuevos medios que contenían las siguientes fuentes de nitrógeno: nitrato ó amonio, 8 mM; nitrito, 1 mM; Asp ó Arg, 0,5 mM. Después de 6 h de tratamiento se determinaron las actividades enzimáticas en los correspondientes extractos crudos.

Las actividades específicas al 100% para la NADH-NO₃Rasa, MVH-NO₃Rasa y NADH-diaforasa fueron respectivamente 44, 38 y 256 mU/mg proteína.

para la síntesis del enzima, es la fuente de nitrógeno adecuada para potenciar dicha síntesis.

En esta misma tabla puede observarse que el nitrito o formas de nitrógeno orgánico (arginina o aspártico) frenan sensiblemente la síntesis de la nitrato reductasa.

La Fig. 9 muestra la cinética de la síntesis de la nitrato reductasa de A. braunii en un cultivo en fase exponencial de crecimiento y con nitrato como única fuente de nitrógeno. La síntesis del enzima comienza rápidamente cuando se elimina el amonio del medio y alcanza su valor máximo a las 4 h aproximadamente de poner las células en nitrato, valor que, por otra parte, permanece prácticamente constante durante el crecimiento exponencial del alga.

Cuando células de A. braunii creciendo en amonio como fuente de nitrógeno, y que por tanto carecían prácticamente del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa, se transferían a nuevos medios conteniendo cantidades crecientes de nitrato, el nivel de actividad de la nitrato reductasa sintetizada de novo presentaba una irregular dependencia de la concentración de nitrato en el medio, siendo máximo su valor para 8 mM de nitrato (Fig. 10,A).

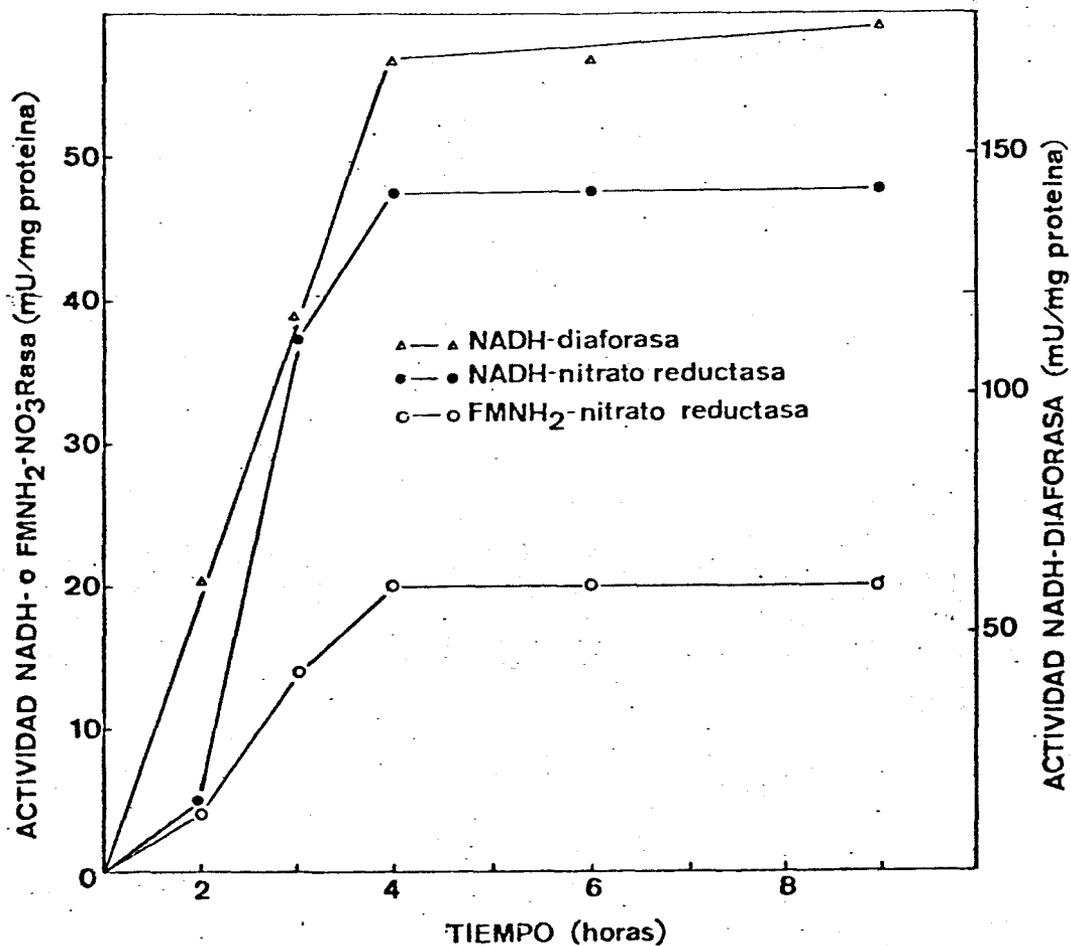


Fig. 9. Cinética de la derrepresión del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa de *A. braunii*.— Células cultivadas durante 24 h en amonio, se recogieron, se lavaron y se resuspendieron (tiempo cero) en un medio de cultivo con nitrato (8 mM).

Las actividades del complejo NAD(P)H se estimaron en los correspondientes extractos crudos a los tiempos indicados.

Fig. 10. Efecto de la concentración de nitrato en el medio de cultivo sobre la derrepresión de la nitrato reductasa de *A. braunii*.- Células cultivadas durante 24 h en amonio, se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en nuevos medios de cultivo que contenían nitrato a las concentraciones que se indican. Al cabo de 4 h se determinaron las distintas actividades en los correspondientes extractos crudos, antes (A), y después de reactivarlos durante 2 min con 0,3 mM de ferricianuro (B).

Sin embargo, cuando se añade ferricianuro a los correspondientes extractos crudos, y la nitrato reductasa se reactiva completamente (Losada et al., 1973), el nivel de las actividades nitrato reductasa es semejante al de las diaforasas y el máximo se alcanza para una concentración de nitrato 4 mM (Fig. 10, B).

Es interesante resaltar aquí que en los estudios de represión-inducción hasta ahora realizados, todas las actividades del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa, i.e. NAD(P)H-nitrato reductasa, FNH₂ (o MVH)-nitrato reductasa y NAD(P)H-diaforasa, se comportan de forma extraordinariamente parecida.

III.4.2. *Regulación de la actividad nitrato reductasa*

III.4.2.1. Interconversión in vivo de la nitrato reductasa de *A. braunii*

La Tabla V muestra que cuando células de *A. braunii*, creciendo autotróficamente en la luz con nitrato, se transfieren a un medio con amonio o metilamina (en presencia o ausencia de nitrato), se produce un rápido y pronunciado decrecimiento en el nivel de actividad de la nitrato

TABLA V

INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO REDUCTASA DE A. braunii POR
DISTINTAS FUENTES DE NITROGENO

Adición	Actividades específicas relativas		
	NADH-NO ₃ Rasa ^a	MVH-NO ₃ Rasa	NADH-diaforasa ^a
NO ₃ ⁻	100	100	100
NH ₄ ⁺	19	17	100
NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	22	21	100
Metilamina	18	19	100
NO ₃ ⁻ + Metilamina	21	24	96
Ninguna	65	54	92

a) Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó NADPH en lugar de NADH como donador de electrones.

Células cultivadas en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos, se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en nuevos medios que contenían las fuentes de nitrógeno indicadas. Nitrato, 8 mM; amonio, 16 mM; metilamina, 30 mM. A los 90 min se determinaron las actividades específicas de los correspondientes extractos crudos.

Las actividades específicas al 100% para la NADH-NO₃Rasa, MVH-NO₃Rasa y NADH-diaforasa fueron respectivamente 82, 71 y 270 mU/mg proteína.

reductasa (tanto NAD(P)H-nitrato reductasa, como MVH-nitrato reductasa), mientras que la otra actividad del complejo, la NAD(P)H-diaforasa, no se afecta significativamente. Este descenso de la actividad nitrato reductasa, causado por amonio o metilamina, no se debe a represión o degradación del enzima, sino más bien a su inactivación, que se ha visto es reversible, ya que extractos crudos preparados a partir de células previamente tratadas con amonio o metilamina, pueden recuperar completamente la actividad nitrato reductasa original por simple tratamiento con pequeñas cantidades de ferricianuro, que reoxida a la proteína.

Es interesante añadir que la ausencia de fuente de nitrógeno en el medio no conduce a una inactivación significativa de la nitrato reductasa en comparación con el efecto provocado por amonio o metilamina.

La ausencia de aire en el medio de cultivo no parece tener un efecto apreciable sobre la actividad nitrato reductasa, y tampoco protege al enzima contra la inactivación in vivo provocada por el amonio (Tabla VI).

TABLA VI

EFFECTO DE LA AIREACION Y FUENTE DE NITROGENO SOBRE LA INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO REDUCTASA DE A. braunii

Tratamiento	Actividades específicas relativas		
	NADH-NO ₃ Rasa ^a	MVH-NO ₃ Rasa	NADH-diaforasa ^a
NO ₃ ⁻	100	100	100
NO ₃ ⁻ menos aire	72	78	92
NO ₃ ⁻ + NH ₄ ⁺	19	14	90
NH ₄ ⁺	19	11	91
NH ₄ ⁺ menos aire	15	9	74

a) Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó NADPH en lugar de NADH como donador de electrones.

Células cultivadas en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos se recogieron, se lavaron y se resuspendieron en nuevos medios que contenían las fuentes de nitrógeno indicadas, sometiendo durante 90 min a los tratamientos correspondientes. Nitrato, 8 mM; amonio, 16 mM. La eliminación de la aireación se realizó según se describe en Métodos.

Las actividades específicas al 100% para la NADH-NO₃Rasa, MVH-NO₃Rasa y NADH-diaforasa fueron respectivamente 64, 58 y 326 mU/mg proteína.

La Tabla VII muestra que la inactivación in vivo de la nitrato reductasa de A. braunii producida por amonio o metilamina no tiene lugar en presencia de menadiona (vitamina k_3) que, actúa como aceptor del poder reductor fabricado durante el proceso fotosintético (Losada, 1976 b).

La Fig. 11 muestra la inactivación in vivo de la nitrato reductasa de A. braunii causada por adición de amonio a células creciendo en nitrato, así como la reactivación in vivo del enzima inactivo que ocurre al eliminar el amonio del medio de cultivo en presencia de luz. La menadiona, que hemos visto (Tabla VII) protege al enzima contra su inactivación in vivo estimula fuertemente la reactivación de la nitrato reductasa.

Los resultados mostrados en la Tabla VIII indican que el amonio impide la utilización de nitrato por las células. Además el nivel intracelular de nitrato no desciende en presencia de amonio, lo cual indica que bajo las condiciones utilizadas, el nitrato no puede ser asimilado. En medio líquido y a la luz, las células de Ankistrodesmus pueden crecer durante varios días con amonio como fuente de nitrógeno tan fácilmente como con nitrato. Por otro lado, el crecimiento con metilamina como fuente

TABLA VII

PROTECCION POR MENADIONA CONTRA LA INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO REDUCTASA DE A. braunii POR ADICION DE AMONIO O METILAMINA

Adición	Actividades específicas relativas		
	NADH-NO ₃ Rasa ^a	MVH-NO ₃ Rasa	NADH-diaforasa ^a
NO ₃ ⁻	100	100	100
+ NH ₄ ⁺	56	54	100
+ NH ₄ ⁺ + menadiona	135	111	85
+ Metilamina	45	46	96
+ Metilamina + menadiona	111	112	91

a) Resultados similares se obtuvieron cuando se utilizó NADPH en lugar de NADH como donador de electrones.

Células cultivadas en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos se recogieron, se lavaron y se sometieron a los tratamientos indicados durante 90 min. Nitrato, 8 mM; amonio, 16 mM; metilamina, 30 mM; menadiona, 0,3 mM.

Las actividades específicas al 100% para la NADH-NO₃Rasa, MVH-NO₃Rasa y NADH-diaforasa fueron respectivamente 90, 78 y 350 mU/mg proteína.

TABLA VIII

EFFECTO DEL AMONIO SOBRE LA ABSORCION DE NITRATO POR CELULAS
DE A. braunii

Tiempo (horas)	Nitrate en el medio (mM)		Nitrate en las células (μ moles/g peso fresco)	
	- NH_4^+	+ NH_4^+	- NH_4^+	+ NH_4^+
0	11,0	11,0	10,4	10,4
2	10,6	11,0	10,7	10,5
8	10,2	11,0	11,4	10,8
24	8,8	11,0	15,9	12,0
48	7,2	11,0	18,0	14,0

Se añadió nitrato (11 mM), sólo ó más amonio (16 mM) a un cultivo de A. braunii cultivado durante 24 h sin fuente de nitrógeno. A los tiempos indicados se determinó el contenido de nitrato de los medios de cultivo y de las células como se describe en Métodos.

de nitrógeno es deficiente bajo condiciones experimentales similares, aún en presencia de nitrato (resultados no mostrados).

III.4.2.2. Interconversión in vitro de la nitrato reductasa de A. braunii

La Fig. 12 muestra que cuando la nitrato reductasa se preincuba con piridín nucleótidos reducidos el enzima se inactiva; 0,3 mM de piridín nucleótido reducido en la mezcla de incubación es prácticamente saturante en su efecto inactivante sobre la nitrato reductasa. El NADH es más efectivo que el NADPH en dicha inactivación.

Esta inactivación del enzima es aparentemente similar a la observada in vivo por la acción del amonio o la metilamina, ya que: a) la inactivación afecta a la actividad NAD(P)H-nitrato reductasa (y consecuentemente a la FNH₂ (o MVH)-nitrato reductasa) y no a la actividad NAD(P)H-diaforasa del complejo enzimático, y b) el enzima inactivo puede reactivarse completamente in vitro, por tratamiento con ferricianuro.

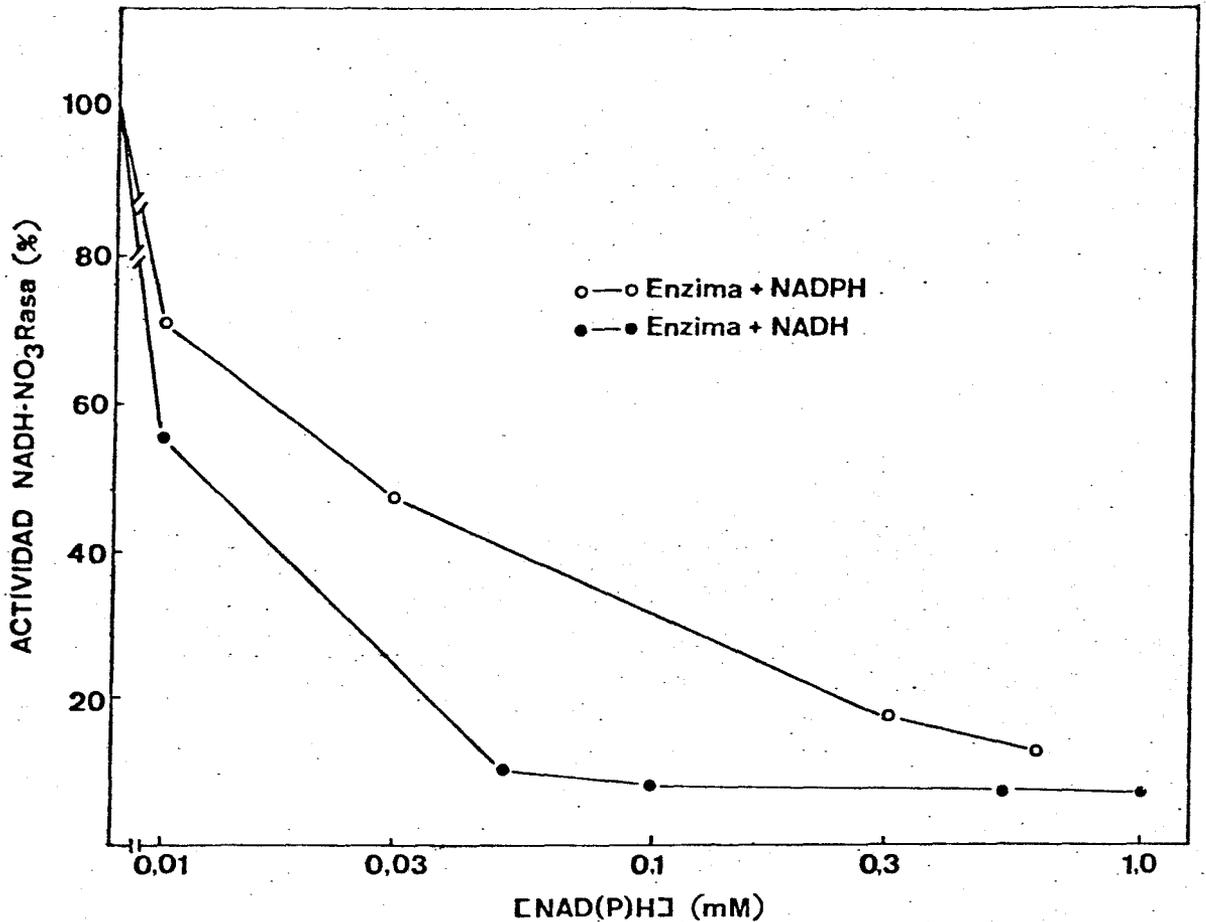


Fig. 12. Efecto de la concentración de NAD(P)H sobre la inactivación de la nitrato reductasa de *A. braunii*.— Nitrato reductasa parcialmente purificada (0,45 mg de proteína) se incubó durante 100 min a 0°C en 1 ml de tampón Tris-ClH, 0,05 M, pH 7,5, conteniendo NAD(P)H a las concentraciones indicadas.

La actividad enzimática se determinó por la adición de alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación a los reactivos del ensayo (ver Métodos). El 100% de actividad NADH-nitrato reductasa fué 420 mU/mg proteína.

La Fig. 13 muestra la cinética de inactivación in vitro de la nitrato reductasa de A. braunii por preincubación con NADH o NADPH 0,3 mM. Bajo estas condiciones experimentales se observa una inactivación de un 75% aproximadamente al cabo de 80 min.

El ADP coopera específicamente con el NADH, pero no con el NADPH, en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de A. braunii (Tabla IX). ATP, AMP ó GDP carecen de esta peculiar propiedad del ADP, que por otra parte no ejerce efecto significativo sobre la actividad del enzima cuando se usa NADPH, que también es un efectivo donador de electrones de la nitrato reductasa de Ankistrodesmus, como agente inactivante.

Con objeto de excluir la posible influencia de la interacción de la nitrato reductasa con otras proteínas en este tipo de inactivación, hemos hecho un experimento semejante al anterior pero utilizando una preparación pura de nitrato reductasa de A. braunii. Los resultados obtenidos fueron muy similares (Tabla X), pero la inactivación es más rápida y eficaz en este caso.

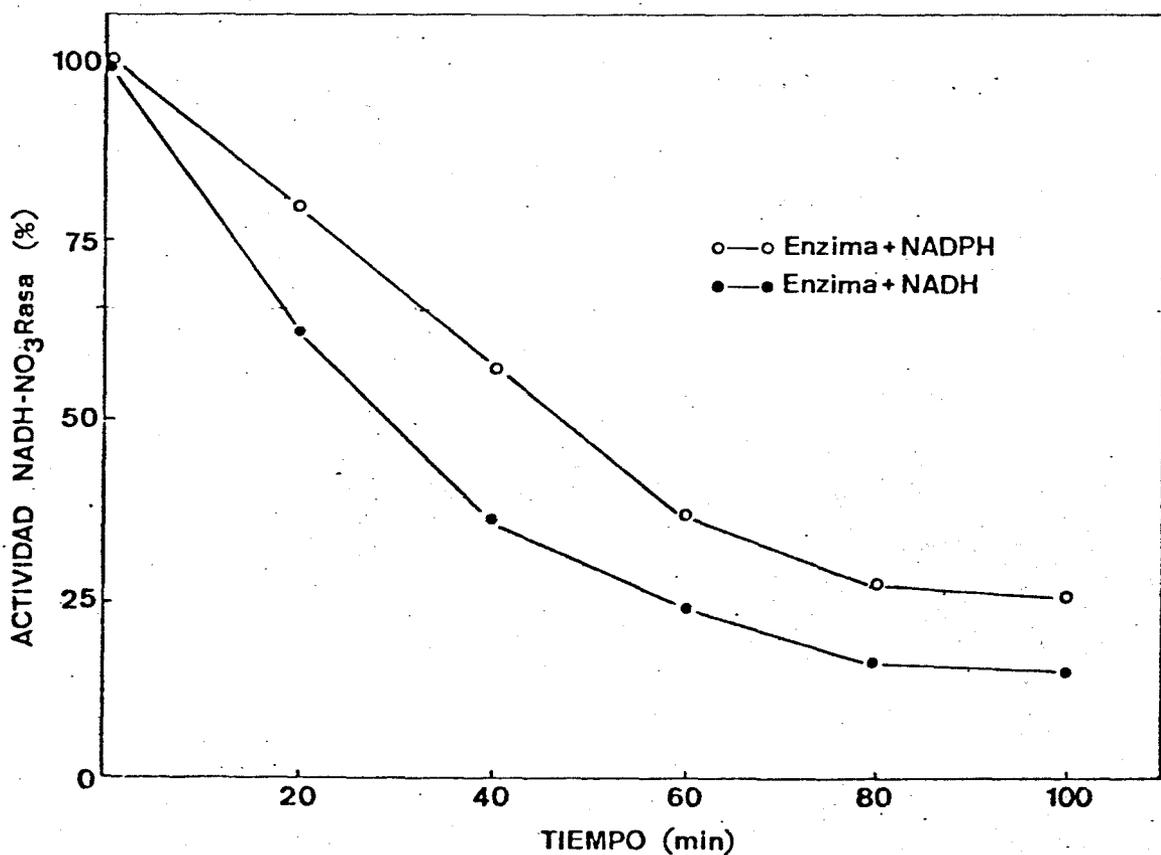


Fig. 13. *Cinética de inactivación de la nitrato reductasa de A. braunii por preincubación con piridín nucleótidos reducidos.*— Las condiciones experimentales son similares a las de la Fig. 12, cuando se usó NAD(P)H 0,3 mM. La actividad enzimática se ensayó a los tiempos indicados.

TABLA IX

COOPERACION ESPECIFICA DEL ADP CON EL NADH EN LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA PARCIALMENTE PURIFICADA DE A. braunii

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	100
NADH	54
NADH + ATP	53
NADH + ADP	34
NADH + AMP	53
NADH + GDP	49
NADPH	61
NADPH + ADP	59

Nitrato reductasa parcialmente purificada (0,43 mg de proteína), se incubó durante 100 min a 0°C en 1 ml de Tris-ClH, 0,05 M, pH 7,5, conteniendo los nucleótidos indicados a una concentración final de 0,3 mM cada uno. La actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo (ver Métodos).

El 100% de actividad específica para la NADH-nitrato reductasa fué 430 mU/mg proteína.

TABLA X

COOPERACION ESPECIFICA DEL ADP CON EL NADH EN LA INACTIVACION
DE LA NITRATO REDUCTASA PURIFICADA DE A. braunii

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	100
NADH	36
NADH + ATP	35
NADH + ADP	19
NADH + AMP	30
NADH + GDP	33
NADPH	40
NADPH + ADP	39

Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la Tabla IX, excepto que se utilizó una preparación purificada (0,018 mg) y que la preincubación tuvo lugar durante 30 min.

El 100% de actividad específica para la NADH-nitrato reductasa fué 12 U/mg proteína.

Los resultados recogidos en la Fig. 14 muestran que la cooperación entre NADH y ADP para inactivar la nitrato reductasa parcialmente purificada de A. braunii es máxima, cuando la concentración utilizada de ADP es equimolecular con la de NADH (0,3 mM). A concentraciones más altas (alrededor de 3 mM) el ADP no afecta a la actividad enzimática. Sin embargo, cuando en experimentos de este tipo, utilizamos una preparación pura de nitrato reductasa, el efecto potenciador del ADP en la inactivación del enzima por NADH se presenta a una concentración equimolecular (0,3 mM) y permanece constante aunque se aumente su concentración (Fig. 15).

Por último se estudió la cinética de inactivación del enzima por preincubación con NADH y ADP a concentraciones equimoleculares. Los resultados presentados en la Fig. 16, muestran que la inactivación del enzima era del 60% a los 20 min de incubación en presencia de NADH y ADP, mientras que no llegaba al 20% cuando la preincubación sólo contenía NADH.

La inactivación de la nitrato reductasa aquí presentada radica en la parte terminal del enzima, ya

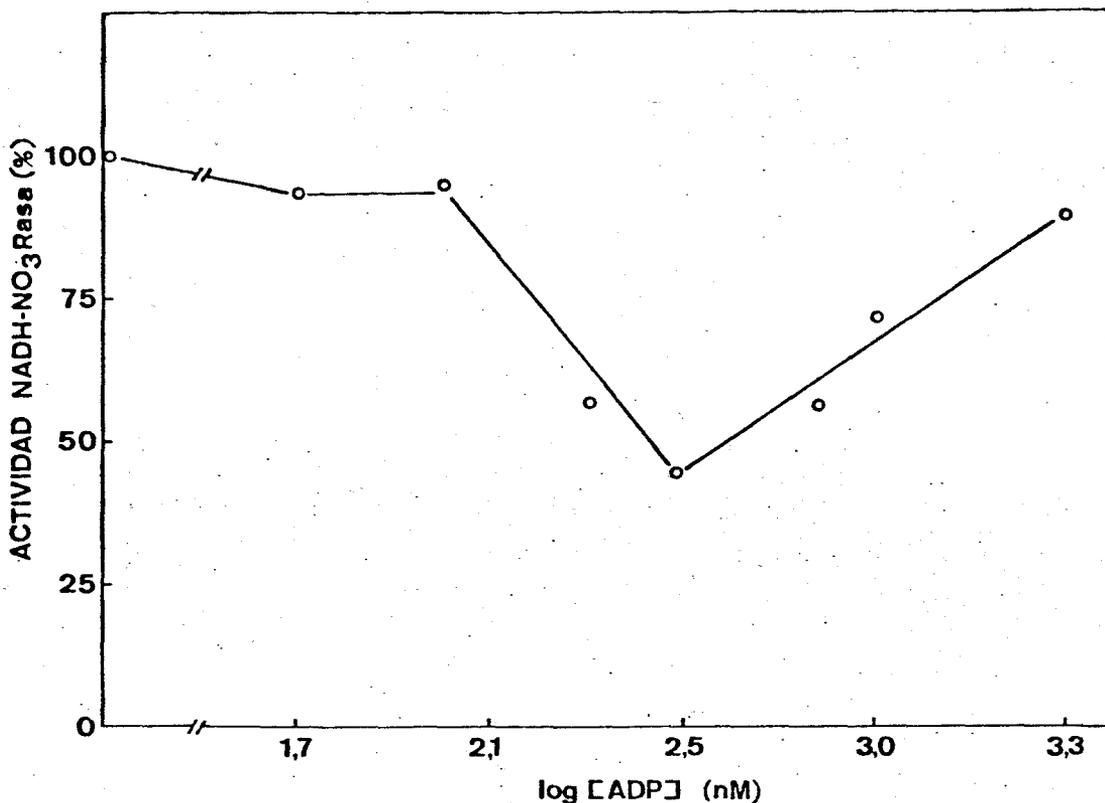


Fig. 14. Efecto de la concentración de ADP sobre la inactivación *in vitro* de la nitrato reductasa de *A. braunii* por NADH y ADP. - Nitrato reductasa parcialmente purificada (0,38 mg de proteína) se incubó durante 100 min a 0°C, en 1 ml de tampón Tris-ClH, 0,05 M, pH 7,5, conteniendo NADH 0,3 mM y ADP a las concentraciones indicadas.

La actividad del enzima se midió en alícuotas de las mezclas de incubación. 100% de actividad NADH-nitrato reductasa fué 480 mU/mg proteína.

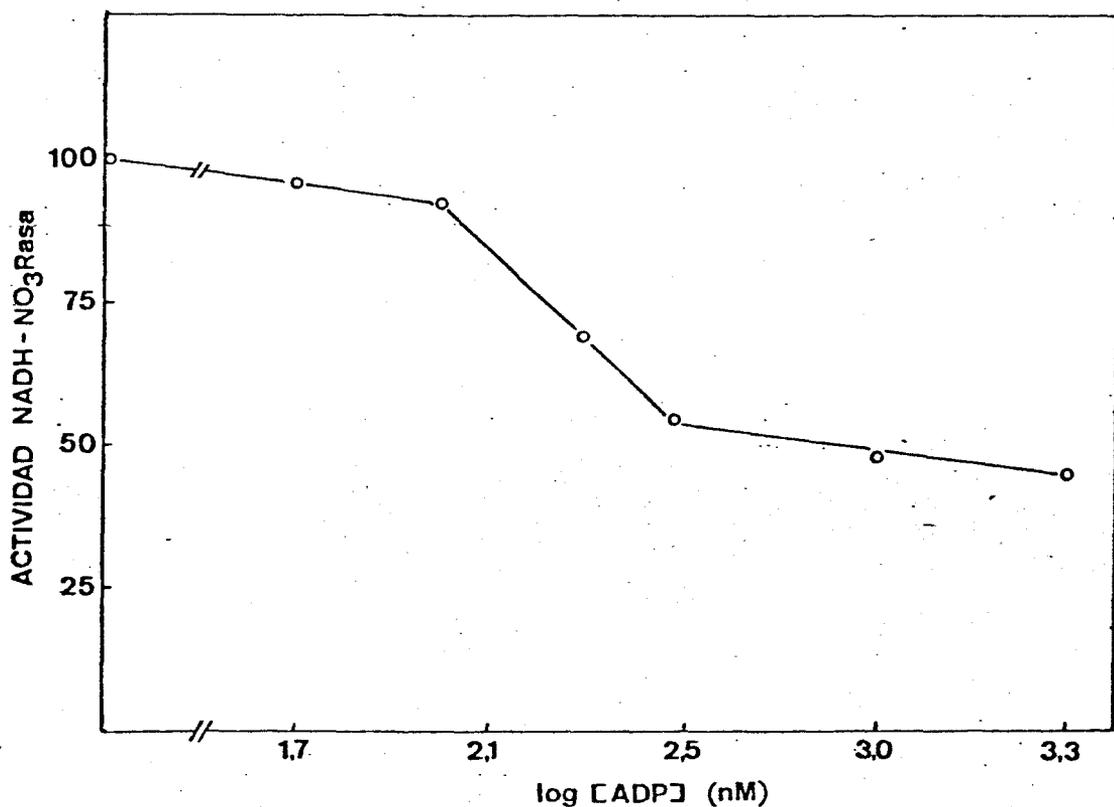


Fig. 15. *Efecto de la concentración de ADP sobre la inactivación in vitro de la nitrato reductasa pura de A. braunii por NADH y ADP.*— Las condiciones experimentales fueron semejantes a las de la Fig. 14, excepto que se usó enzima puro (0,015 mg) en las mezclas de incubación.

100% de actividad NADH-nitrato reductasa fué 20 U/mg proteína.

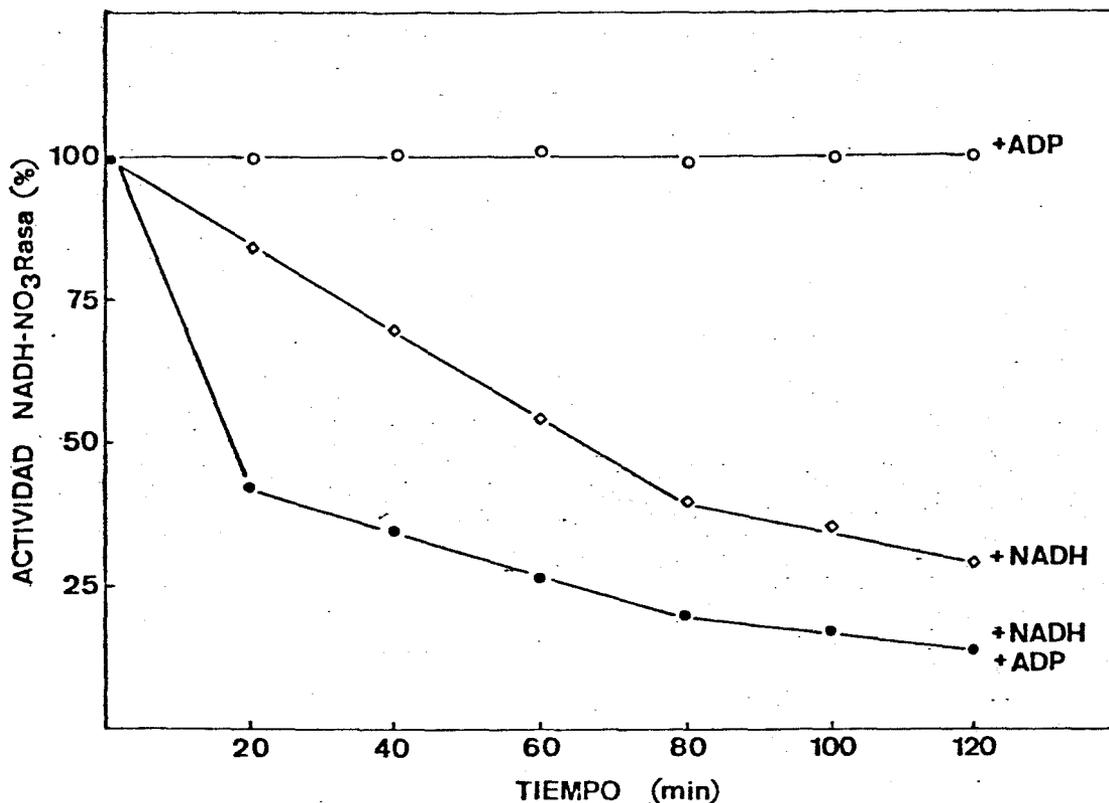


Fig. 16. *Cinética de la inactivación de la nitrato reductasa de A. braunii por NADH y ADP.*— Nitrato reductasa parcialmente purificada (0,41 mg de proteína) se incubó a 0°C en 1 ml de tampón Tris-ClH, 0,05 M, pH 7,5, conteniendo NADH 0,3 mM y/o ADP 0,3 mM, según se indica. La actividad enzimática se midió a los tiempos indicados en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación.

100% de actividad NADH-nitrato reductasa fué 390 mU/mg proteína.

que la actividad NADH-diaforasa del complejo enzimático no se afectaba significativamente, en ningún caso, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Por otra parte, el caracter reversible de dichas inactivaciones se puso de manifiesto porque cada preparación enzimática recuperaba su actividad inicial al tratarla con ferri-cianuro.

IV. DISCUSSION

Los resultados aquí descritos han aportado nuevos conocimientos sobre la caracterización, composición y mecanismo de regulación del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa del alga verde Ankistrodesmus braunii.

En primer lugar se ha puesto a punto un sencillo método de purificación, basado en la cromatografía de afinidad con Sefarosa-Azul Dextrano que ha significado una considerable simplificación en trabajo y tiempo, con respecto a aquellos otros descritos hasta ahora que han utilizado básicamente técnicas convencionales para la purificación de la nitrato reductasa de A. braunii (Ahmed y Spiller, 1976). Por otra parte, el método aquí descrito supone una importante mejora en el rendimiento y en la calidad de la preparación enzimática obtenida, ya que ésta presenta una actividad específica de 50 U/mg aproximadamente, con una recuperación de un 70% y un factor de purificación de 1.200 veces (Tabla I).

La nitrato reductasa de Chlorella vulgaris ha sido purificada hasta homogeneidad por un método que también incluye como paso fundamental la cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano (Solomonson, 1975).

Es importante resaltar aquí las diferencias básicas que existen en el comportamiento de las nitrato reductasas de ambos organismos durante su elución de la columna:

1. El enzima de Chlorella vulgaris no puede disociarse del Azul Dextrano por tampones de alta fuerza iónica. La elución del enzima de la columna requiere específicamente la presencia de NADH en el tampón de elución, siendo muy eficaz el nucleótido a concentraciones del orden de 5 μ M.

2. La nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii, que según nuestros datos, parece ser un enzima bastante similar en propiedades y grupos prostéticos al de Chlorella vulgaris, puede eluirse fácilmente de la columna, ~~junto con otras proteínas, por tratamiento con un tampón de alta fuerza iónica~~ (Figuras 1 y 2).

3. Es muy importante hacer hincapié en que la elución del enzima de Ankistrodesmus no se puede conseguir por la simple adición de NADH, incluso a concentración 0,5 mM, al tampón de lavado. La desestabilización de la unión del enzima a la Sefarosa-Azul Dextrano se puede

conseguir, de forma específica, por la acción combinada del NADH, sustrato fisiológico del enzima, y el FAD, que es uno de sus grupos prostéticos (Figuras 3 y 4).

Se ha descrito ampliamente la presencia de distintas formas de un mismo enzima (isoenzimas) dentro de diversos organismos (Ureta, 1978). Los isoenzimas pueden diferenciarse en muy diversos aspectos, tales como sus valores para la constante de Michaelis (Chen y Jones, 1970; Maino y Young, 1974), su diferente especificidad por el sustrato o cofactor (Omata Jolly et al., 1976; Shen et al., 1976), por su localización intracelular (Mo et al., 1973; Wenger y Bernofsky, 1971), o simplemente por su movilidad electroforética (Stachow y Sanwal, 1967; Notton et al., 1972).

Al someter una preparación purificada de Ankis-trodesmus braunii a electroforesis en gel de poliacrilamida se obtienen dos bandas de proteína, que además presentan actividad catalítica para reducir nitrato y reacción positiva a la tinción del grupo hemo (Fig. 5), lo que indica la posible presencia en nuestra preparación de dos formas moleculares de nitrato reductasa o isoenzimas, con

distinta movilidad electroforética.

Un análisis posterior de la actividad nitrato reductasa de estas dos proteínas confirmó la idea de que se trata de dos isoenzimas y no de un artefacto electroforético, ya que dichos isoenzimas presentaban distinta especificidad por el piridín nucleótido reducido que dona los electrones para la reducción de nitrato. Mientras que la nitrato reductasa de menor movilidad electroforética (L) es prácticamente específica para NADH, la de mayor movilidad (R) utiliza indistintamente NADH o NADPH como donador de electrones (Tabla II).

La demostración de la presencia de dos formas moleculares de nitrato reductasa en el alga verde Ankistrodesmus braunii es muy interesante, ya que hasta el momento sólo se había descrito la presencia de tales isoenzimas de nitrato reductasa en plantas superiores como la soja (Omata Jolly et al., 1976), arroz (Shen et al., 1976), y espinaca (Notton et al., 1972), siendo por tanto ésta la primera vez que se ha encontrado en algas verdes. El papel fisiológico de estos isoenzimas en la asimilación de nitrato por organismos fotosintéticos queda por

estudiar, aunque probablemente tenga fines regulatorios relacionados con sus propiedades cinéticas (Campbell, 1976).

Desde que Garret y Nason (1967) sugirieron que podía haber un citocromo b_{557} asociado a la nitrato reductasa de Neurospora, se ha descrito la presencia de este grupo prostético en todas las nitrato reductasas que se han purificado adecuadamente (Vennesland y Guerrero, en prensa), habiéndose publicado la presencia de 2 moles de hemo por mol de enzima para la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris (Solomonson et al., 1975), mientras que el enzima de hongos parece contener un solo mol de citocromo por mol de enzima (Guerrero y Gutierrez, 1977).

El espectro de absorción de la nitrato reductasa purificada de A. braunii (enzima oxidado) (Figuras 6 y 7), presenta un máximo a 416 nm (Soret) y un hombro a 450 nm. Cuando se reduce el enzima con NAD(P)H (donadores fisiológicos) o con ditionito (reducción química), el espectro de absorción del enzima en el visible es característico de la presencia de un hemo reducido, observándose un desplazamiento de la banda Soret desde 416 a

424 nm, que además va acompañado de un incremento de la absorbancia a esta longitud de onda. Por otra parte, el hombro a 450 nm se atenúa significativamente y aparecen dos nuevos máximos de absorción a 527 (banda β) y 557 (banda α) nm. Esto indica la presencia de un citocromo, probablemente del tipo b_{557} y flavina (hombro a 450 nm) como grupos prostéticos del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa de A. braunii.

La reducción completa del citocromo b de la nitrato reductasa purificada de Rhodotorula glutinis con NAD(P)H requiere la adición de FAD a la preparación enzimática (Guerrero y Gutierrez, 1977), lo que indica que la flavina está situada antes que el citocromo b en la cadena de transporte de electrones de la proteína.

Es interesante resaltar que cuando se añade nitrato al enzima nativo, no se observaron cambios significativos en las propiedades espectrales de la proteína, sugiriendo que el sitio activo donde se une el sustrato al enzima no es el citocromo o la flavina.

El enzima reducido con NAD(P)H se reoxida rá-

pidamente por adición de nitrato según indican los cambios observados en el espectro de absorción, que se identifica con el del enzima nativo. Esto indica que el nitrato, aceptor fisiológico de electrones del enzima, oxida fácilmente a la flavina y al citocromo de la nitrato reductasa, grupos prostéticos que tienen por tanto un papel funcional en la reducción enzimática de nitrato a nitrito. Resultados similares se han observado con el enzima de Neurospora crassa (Garret y Nason, 1969), Chlorella vulgaris (Solomonson y Vennesland, 1972) y Rhodotorula glutinis (Guerrero y Gutierrez, 1977).

La nitrato reductasa reducida de A. braunii también se reoxida, aunque más lentamente, por el oxígeno, probablemente debido a una pequeña actividad oxidasa que lleva asociada y que elimina lentamente los electrones del piridín nucleótido, recuperando el enzima su espectro de absorción original. El citocromo b de esta proteína es por tanto autooxidable.

El espectro de absorción del derivado hemocromógeno de la nitrato reductasa de A. braunii, en presencia de piridina y ditionito, confirma la idea de que el cito-

cromo del enzima es de tipo b_{557} , ya que presenta máximos de absorción a 414 (Soret), 522 (α) y 551 (β) nm (Fig. 8), que se corresponden con los del piridín hemocromógeno derivado de protoporfirina IX (Garret y Nason, 1969). Derivados semejantes se han caracterizado previamente en las nitrato reductasas del hongo Neurospora crassa (Garret y Nason, 1969) con máximos de absorción a 417, 524 y 553 nm, y del alga verde Chlorella vulgaris (Solomonson y Vennesland, 1972) con máximos a 418, 524 y 555 nm, concluyéndose en ambos casos también la presencia de un citocromo de tipo b, lo que hace pensar que este citocromo es un componente general de las nitrato reductasas de tipo asimilatorio, que utilizan piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones.

La regulación de la reducción asimilatoria del nitrato es un proceso complejo que parece presentarse a varios niveles. El primero de ellos es el de transporte, puesto que la entrada de nitrato en las células es anterior a su reducción; una vez dentro, el control se realiza tanto a nivel de síntesis como de actividad de los enzimas implicados en la asimilación de nitrato. Se ha demostrado que la capacidad de utilizar nitrato en algas y plantas superiores varía en respuesta a los cambios de

las condiciones ambientales, tales como la intensidad de luz, niveles de CO_2 y O_2 , temperatura, fuente de nitrógeno y otros factores (Losada 1976 a y b; Hewitt et al., 1976).

El amonio, producto final de la reducción asimilatoria de nitrato, tiene in vivo un doble efecto sobre la utilización de nitrato : 1. Inhibe la utilización de nitrato por las células y 2. Inactiva reversiblemente la nitrato reductasa terminal del complejo enzimático en cargado de reducir el nitrato a nitrito (Losada, 1976 a). Todo hace pensar que la nitrato reductasa es un punto crítico donde radica un importante control de la utiliza ción de nitrato. Por otra parte, se sabe que el transpor te de nitrato al interior de la célula es mediado por un sistema que presenta cinéticas típicas de Michaelis-Menten (Schloemer y Garret, 1974) y que se inhibe por amonio. Poco se sabe acerca de este sistema en algas verdes y por ello no puede desecharse todavía la posibilidad de que radique en él también un importante punto de control en la utilización del nitrato.

Cuando las células de Ankistrodesmus braunii

se cultivan utilizando amonio como fuente de nitrógeno, el nivel de las actividades del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa es negligible (Tabla III), indicando que el amonio reprime la síntesis de este enzima. Esta represión tiene lugar aún en presencia de nitrato. Cuando el amonio se elimina del medio de cultivo, las células de Ankistrodesmus sintetizan altos niveles de nitrato reductasa aún en ausencia de fuente de nitrógeno (Tabla IV), sin embargo dicha síntesis se estimula sensiblemente por la presencia de nitrato en el medio (Figuras 9 y 10), debido probablemente a que el nitrato es una adecuada fuente de nitrógeno más que a un efecto inductor específico sobre la síntesis del enzima. Oosterheld (1971) ha propuesto que en las células de Ankistrodesmus deficientes en nitrógeno tiene lugar la formación de pequeñas cantidades de nitrato y nitrito, por oxidación de nitrógeno orgánico, que pueden explicar los altos niveles de nitrato reductasa encontrados en ausencia de fuente de nitrógeno. Por otra parte en plantas superiores, el nitrato parece ser esencial para la síntesis del enzima (Beevers y Hageman, 1969;1972; Hewitt et al., 1976). Estos resultados están de acuerdo con observaciones previas en este alga (Rignano, 1970) y con los obtenidos en otras algas verdes como

Chlorella fusca (Losada et al., 1970; Vega et al., 1971) y Chlamydomonas reinhardtii (Herrera et al., 1972).

El mecanismo de control de la síntesis de la nitrato reductasa a niveles de transcripción y transducción permanece prácticamente desconocido. Por otra parte, una serie de compuestos no muy claramente relacionados a priori con la asimilación de nitrato, afectan a la síntesis de la nitrato reductasa en ciertas especies de algas y plantas; tal es el caso del herbicida simazina que utilizado a concentraciones no tóxicas produce un sensible incremento en el nivel de nitrato reductasa de guisantes, arroz, maíz, etc..., y por ello se ha empleado para incrementar el contenido proteico de alimentos vegetales (Ries et al., 1967; Tweedy y Ries, 1967; Sawkney y Naik, 1972).

Travis et al. (1969) han mostrado que la cicloheximida previene la caída normal de nivel de nitrato reductasa que tiene lugar en hojas de cebada cuando se ponen en la oscuridad. Esto supone la participación de una proteína en la degradación de la nitrato reductasa. Se ha aislado una proteína a partir de semillas de maíz

(Wallace, 1973; 1974), que inactiva nitrato reductasas de distintos orígenes como los de Neurospora y plantas superiores, pero no el enzima de origen bacteriano. Parece ser que se trata de un enzima proteolítico que ataca particularmente a la mitad diaforasa de la nitrato reductasa (Wallace, 1975). En Neurospora la presencia de nitrato en el medio de cultivo hace disminuir la velocidad de degradación in vivo de la nitrato reductasa (Sorger et al., 1974).

Además de los cambios que tienen lugar en los niveles de enzima a tiempos largos, atribuibles a una síntesis y degradación, se ha publicado ampliamente la presencia de variaciones rápidas en el nivel de nitrato reductasa en respuesta a la adición de amonio o a cambios en los factores ambientales (Losada 1976 a y b; Hewitt et al., 1976), y se piensa que estos efectos se deben a procesos de inactivación y activación del enzima.

Aunque se han propuesto distintos tipos de mecanismos para la regulación de la nitrato reductasa, tales como una interacción reversible proteína-proteína en Lemna (Orebamjo y Stewart, 1975) y la presencia de enzimas

que inactivan específicamente la nitrato reductasa de plantas superiores (Wallace, 1975; Yamaya y Ohira, 1977), una de las formas más interesantes de regulación de la actividad nitrato reductasa es el mecanismo de interconversión que tiene lugar en algas verdes y bacterias verde-azuladas. En estos organismos, el enzima existe en dos formas interconvertibles metabólicamente, una activa y otra inactiva, siendo la proporción relativa de cada una dependiente de la concentración intracelular de algunos metabolitos específicos que a su vez son afectados por cambios en las condiciones ambientales (Losada, 1974; 1976 a y b).

Los resultados que se presentan en este trabajo pueden ser interpretados fácilmente de acuerdo con la hipótesis de la interconversión, en la que la forma activa se inactiva por reducción y la forma inactiva se activa por oxidación.

La adición de amonio, producto final de la reducción de nitrato, o metilamina, un derivado del amonio no metabolizable por el alga, a un cultivo de Ankistrodesmus creciendo en la luz, produce la rápida inactivación de la segunda mitad del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa (Tabla V) y aparentemente bloquea la utilización de nitra-

to por el alga (Tabla VIII). Esta inactivación del enzima resulta ser reversible in vivo, ya que la eliminación del agente inactivante del medio de cultivo origina en las células una rápida recuperación de la actividad nitrato reductasa (Fig. 11).

La esencialidad del poder reductor en la inactivación de la nitrato reductasa radica en las siguientes observaciones :

1. El enzima inactivado in vivo, por amonio o metilamina, puede reactivarse in vitro por preincubación con ferricianuro, agente oxidante y aceptor de electrones de la diaforasa del complejo (Paneque y Losada, 1966).

2. La presencia de menadiona, que fotooxida el poder reductor fotosintético (Losada, 1976 b), en el medio de cultivo protege eficazmente a la nitrato reductasa contra su inactivación promovida por amonio o metilamina (Tabla VII). Por otra parte la menadiona estimula fuertemente la reactivación in vivo de la nitrato reductasa cuando se elimina del medio el agente inactivante.

3. La actividad terminal del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa de A. braunii se inactiva también por prein-

cubación del enzima, homogéneo o parcialmente purificado, con NAD(P)H, sus donadores fisiológicos de electrones (Figuras 12 y 13). En este caso la actividad original se recupera también por reoxidación de la proteína con ferricianuro.

Se ha descrito que el ADP coopera con el NADH en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella, y que esta cooperación necesita, para ser efectiva, condiciones adecuadas de pH, fuerza iónica, etc. (Chaparro, 1977). Nuestros resultados apoyan la idea de que el ADP coopera específicamente con el NADH, pero no con el NADPH, en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de A. braunii (Tablas IX y X). La cooperación entre los dos nucleótidos es máxima cuando ambos se encuentran a concentraciones equimoleculares (0,3 mM) (Figuras 14, 15 y 16).

La más simple interpretación de estos resultados es que el amonio y la metilamina, producen un incremento en el poder reductor de las células de Ankistrodesmus por un mecanismo que puede radicar en su acción desacoplante de la fotofosforilación no cíclica (Losada, 1974).

El NAD(P)H sólo, o en cooperación con otros metabolitos (probablemente ADP) determinan la inactivación de la nitrato reductasa.

Esta hipótesis está seriamente apoyada por las observaciones de Chaparro et al., (1976) en el alga verde Chlorella, donde concomitantemente con la inactivación del enzima, la metilamina origina un incremento en el nivel celular de NAD(P)H y ADP.

Por otra parte, en nuestro caso podemos decir que el cianuro no es esencial en la inactivación de la nitrato reductasa de algas verdes, modelo propuesto por el grupo de Vennesland (Lorimer et al., 1974) ya que al inactivar el enzima in vitro hemos utilizado una preparación homogénea, donde la posible presencia de trazas de cianuro que pudieran contribuir a la inactivación de la nitrato reductasa es altamente improbable.

Interrumpiendo la aireación en un cultivo de células de Chlamydomonas reinhardtii, se consigue la inactivación completa de la nitrato reductasa en 15 min, debido probablemente a que la baja tensión de oxígeno en el cultivo produce una subida en el nivel intracelular

de poder reductor (Losada et al., 1973). Sin embargo dicho tratamiento tiene un efecto mucho menor sobre el nivel de actividad nitrato reductasa en Ankistrodesmus braunii (Tabla VI). Este efecto de la anaerobiosis sobre un cultivo de Ankistrodesmus se puede explicar como consecuencia de que el nitrato presente en el cultivo probablemente potencia la utilización de fosfato y la fotofosforilación no cíclica (Ullrich-Eberius, 1973), que pueden mantener un nivel intracelular relativamente bajo de ADP, también requerido como vimos anteriormente, para la inactivación de la NAD(P)H-nitrato reductasa.

Por otro lado Pistorius et al. (1976), explican el requerimiento de oxígeno para la inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris como un resultado del efecto estimulante del oxígeno sobre la formación de cinuro, que proponen se requiere, junto con un agente reductor (NADH o NADPH), para inactivar la nitrato reductasa in vivo.

Por último es interesante añadir que la adición de otros desacoplantes, tales como carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Ullrich, 1974) o 2,4-dinitrofe-

nol (Ahmed y Morris, 1967) a células de Ankistrodesmus inhiben la asimilación de nitrato.

V. CONCLUSIONES

1. La nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii se ha purificado hasta homogeneidad por un método que incluye como etapa principal una cromatografía de afinidad en Sefarosa-Azul Dextrano. En un sólo día puede obtenerse una preparación enzimática con una actividad específica de 49 U/mg, una recuperación del 70% y un factor de purificación, con respecto al extracto crudo, de 1.200 veces.
2. La preparación pura de nitrato reductasa contiene dos tipos de moléculas o isoenzimas, con distinta movilidad electroforética, que difieren en su especificidad por el donador de electrones. Mientras que una de ellas es prácticamente específica para el NADH, la otra acepta los electrones indistintamente del NADH o NADPH.
3. La nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii tiene citocromo b_{557} como grupo prostético, según hemos caracterizado por estudios espectrofotométricos del enzima nativo y de su derivado hemocromógeno en piridina.

4. El amonio y la metilamina, represores de todas las actividades del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii, inactivan rápidamente, in vivo, la mitad terminal de este complejo. Esta inactivación es reversible ya que el enzima inactivo puede recuperar su actividad original por eliminación del agente inactivante del medio de cultivo, o, una vez rotas las células, por tratamiento del extracto crudo con ferricianuro.

5. La mitad terminal del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii se inactiva in vitro por preincubación del enzima puro con NAD(P)H, sus donadores de electrones, siendo el NADH más efectivo en su acción inactivante que el NADPH.

6. El ADP potencia específicamente la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii dependiente de NADH, tanto en preparaciones parcialmente purificadas como puras. En todos los casos el enzima recupera su actividad original por tratamiento con ferricianuro.

7. Cuando se añade amonio a un cultivo de células de Ankistrodesmus braunii cesa inmediatamente la uti-
zación de nitrato por el alga.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, J., Morris, I. : Inhibition of nitrate and nitrite reduction by 2,4-dinitrophenol in Ankistrodesmus. Archiv. Mikrobiol. 57, 219-224 (1967)
- Ahmed, J., Spiller, H. : Purification and some properties of the nitrate reductase from Ankistrodesmus braunii. Plant Cell Physiol. 17, 1-10 (1976).
- Aparicio, P.J. : Mecanismo molecular de la reducción del nitrato a nitrito por la nitrato reductasa de plantas. Tesis Doctoral, Universidad de Madrid (1971).
- Aparicio, P.J., Paneque, A., Rodriguez-Lopez, M., Losada, M. : Estudio de la nitrato reductasa del alga Chlorella. Anal. Aula Dei 10, 744-753 (1969).
- Arnon, D.I., Losada, M., Nozaki, M., Togawa, K. : Separation of two light reactions in noncyclic photo-phosphorylation of green plants. Nature 190, 601-610 (1961).
- Axen, R., Porath, J., Ernback, S. : Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. Nature 214, 1302-1304 (1967).
- Bailey, J.L. : Techniques in Protein Chemistry, 2nd Ed., p. 340, Elsevier, Amsterdam 1967.
- Beevers, J.L., Hageman, R.H. : Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 495-522 (1969).
- Beevers, J.L., Hageman, R.H. : Photophysiology, vol. 7,

p. 85, (Ed. A.C. Giose), Academic Press. New York 1972.

Blume, K.G., Hoffbaner, R.W., Busch, D., Arnold, H., Lorh, G.W. : Purification and properties of pyruvate kinase in normal and in pyruvate kinase deficient red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* 227, 364-372 (1971).

Bohme, H.J., Kopperschlager, G., Schulz, J., Hofmann, E. : Affinity chromatography of phosphofructokinase using ciba-cron blue. *J. Chromatogr.* 69, 209-214 (1972).

Campbell, W.H. : Separation of soybean leaf nitrate reductases by affinity chromatography. *Plant Sci. Lett.* 7, 239-247 (1976).

Cawse, P.A. : The determination of nitrate in soil solutions by ultraviolet spectrophotometry. *Analyst* 92, 311-315 (1967).

Cuatrecasas, P. : Protein purification by affinity chromatography. *J. Biol. Chem.* 245, 3059-3065 (1970).

Cuatrecasas, P., Wilcheck, M., Anfinsen, C.B. : Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 636-643 (1968).

Chaparro, A. : Mecanismo de interconversión de la actividad NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla (1977).

Chaparro, A., Maldonado, J.M., Diez, J., Relimpio, A.M.,

Losada, M. : Nitrate reductase inactivation and reducing power and energy charge in Chlorella cells. *Plant Sci. Lett.* 6, 335-342 (1976).

Chen, J.H., Jones, R.F. : Multiple forms of phosphoenolpyruvate carboxylase from Chlamydomonas reinhardtii. *Biochim. Biophys. Acta* 214, 318-325 (1970).

Diez, J., Chaparro, A., Vega, J.M., Relimpio, A. : Studies on the regulation of assimilatory nitrate reductase in Ankistrodesmus braunii. *Planta*, 137, 231-234 (1977).

Diez, J., Maldonado, J.M., Vega, J.M., Relimpio, A. : Regulación del complejo NAD(P)H-nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii. VII congreso de la S.E.B., Resúmenes, p. 50, Pamplona (1977).

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

Garret, R.H., Nason, A. : Involvement of a B-type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of Neurospora crassa. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 1603-1610 (1967).

Garret, R.H., Nason, A. : Further purification and properties of Neurospora nitrate reductase. *J. Biol. Chem.* 244, 2870-2882 (1969).

Gewitz, H.S., Pistorius, E.K., Voss, H., Vennesland, B. : Cyanide formation in preparations from Chlorella and New Zealand spinach leaves: Effect of added aminoacids. *Plan-*

ta 131, 149-153 (1976).

Good, N.E. : Activation of the Hill reaction by amines. Biochim. Biophys. Acta 40, 502-517 (1960).

Guerrero, M.G., Gutierrez, M. : Purification and properties of the NAD(P)H-nitrate reductase of the yeast Rhodotorula glutinis. Biochim. Biophys. Acta 482, 272-285 (1977).

Hageman, R.H., Hucklesby, D.P. : Nitrate reductase from higher plants. En: Methods in Enzimology, vol 23 A, p. 491 (ed. A. San Pietro) Academic Press, New York (1971).

Herrera, J., Paneque, A., Maldonado, J.M., Barea, J.L., Losada, M. : Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in Chlamydomonas reinhardtii. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 996-1003 (1972).

Hewitt, E.J. : Assimilatory nitrate-nitrite reduction. Ann. Re. Plant Physiol. 26, 73-100 (1975).

Hewitt, E.J., Hucklesby, D.P.; Notton, B.A. : Plant Biochemistry , 3rd Edn. (eds. J. Bonner y J.E. Varner) p. 633, Academic Press, New York 1976.

Hjertén, S. : Chromatographic separation according to size of macromolecules and cell particles on column of agarose suspensions. Arch. Biochem. Biophys. 99, 466-475 (1962).

Kessler, E., Langner, W., Ludewig, I., Wiechmann, H. : Studies on microalgae and photosynthetic bacteria. p. 7, University of Tokyo Press, Tokyo, 1963.

Kopperschlager, G., Diezel, W., Freyer, R., Liebe, St., Hofmann, E. : Wechselwirkungen der hefe-phosphofructokinase mit Dextran blau 2000. Eur. J. Biochem. 22, 40-45 (1971).

Jovin, T., Charamback, A., Naughton, H.A. : Apparatus for preparative temperature regulated polyacrilamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 9, 351-364 (1964).

Lorimer, G.H., Gewitz, H., Volcker, V., Solomonson, L.P., Vennesland, B.: The presence of bound cyanide in the naturally inactivated form of nitrate reductase of Chlorella vulgaris. J. Biol. Chem. 249, 6074-6079 (1974).

Losada, M. ; The assimilatory nitrate reducing system and its regulation by ammonia in Chlorella. En: 1st International Symposium on Metabolic Interconversion of enzymes. Outlines of the papers, p. 59. S. Margherita, Italia (1970).

Losada, M. : Interconversion of nitrate and nitrite reductase of the assimilatory type. En: Metabolic Interconversion of Enzymes, p. 257, (eds, O. Wieland, E. Helmerich, H. Holzer). Springer Verlag, Berlin. 1974.

Losada, M. : Metalloenzymes of the nitrate reducing system. J. Moléc. Catal. 1, 245-264 (1976 a).

- Losada, M. : Reducing power and the regulation of photosynthesis. En: Reflections on Biochemistry , p. 73 (eds. A. Kornberg, L. Cornudella, B.L. Horecker, J. Oró). Per gamon Press, Oxford 1976 b.
- Losada, M., Aparicio, P.J., Paneque, A. : Separation of two enzyme activities in the reduction of nitrate with NADH. En: Progress in Photosynthesis Research, vol. III, p. 1504 (ed. H. Metzner), Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Tübingen (1969).
- Losada, M., Arnon, D.I. : Selective inhibitors of photosynthesis. En: Metabolic Inhibitors, vol. 2, p. 559, (eds R.M. Hochster, J.H. Quastel), Academic Press (1963).
- Losada, M., Herrera, J., Maldonado, J.M., Paneque, A. : Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in Chlamydomonas. Plant Sci. Lett. 1, 31-37 (1973).
- Losada, M., Paneque, A., Aparicio, P.J., Vega, J.M., Cárdenas, J., Herrera, J. : Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in Chlorella. Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 1009-1015 (1970).
- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L., Randall, R.J. : Protein measurements with the Folin phenol reagents. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).
- Maino, V.C., Young, F.E. : Regulation of glucosylation of teichoic acid: II. Partial characterization of phosphoglucomutase in Bacillus subtilis 168. J. Biol. Chem. 249, 5176-5181 (1974).

- Maldonado, J.M., Herrera, J., Paneque, A., Losada, M. : Reversible inactivation by NADH and ADP of Chlorella fusca nitrate reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 51, 27-33 (1973).
- March, C., Parik, I., Cuatrecasas, P. : A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. Anal. Biochem. 60, 149-152 (1974).
- Mo, Y., Harris, B.G., Gracy, R.W. : Triosephosphate isomerases and aldolases from light- and dark-grown Euglena gracilis. Arch. Biochem. Biophys. 157, 580-587 (1973).
- Moreno, C.G. : Interconversión entre una forma oxidada y activa de la nitrato reductasa y otra inactiva y reducida. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1973).
- Moreno, C.G., Aparicio, P.J., Palacián, E., Losada, M. : Interconversion of the active and inactive forms of Chlorella nitrate reductase. FEBS Letters 26, 11-14 (1972).
- Morris, J. : Nitrogen assimilation and protein synthesis. En: Algal Physiology and Biochemistry. Botanical Monographs, vol. 10, p. 583, (ed. W.D.P. Stewart) Oxford: Blackwell 1974.
- Notton, B.A., Hewitt, E.J., Fielding, A.H. : Isoelectric focusing of spinach nitrate reductase and its tungsten analogue. Phytochem. 11, 2447-2449 (1972).
- Oesterheld, H. : Das verhalten von nitratreductase, nitrit

reductase, hydrogenase und anderen enzymen von Ankistrodesmus braunii bei stickstoffmangel. Arch. Mikrobiol. 79, 25-43 (1971).

Omata Jolly, S., Campbell, W., Tolbert, N.E. : NADPH- and NADH-nitrate reductases from soybean leaves. Arch. Biochem. Biophys. 174, 431-439 (1976).

Orebamjo, T.O., Stewart, G.R. : Ammonium inactivation of nitrate reductase in Lemna minor. Blanta 122, 37-44 (1975).

Ortega, T., Castillo, F., Cárdenas, J., Losada, M. : Inactivation by ammonia of the photosynthetic reduction of nitrate in Nostoc muscorum particles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 823-831 (1977).

Paneque, A., Aparicio, P.J., Catalina, L., Losada, M. : Enzymatic reduction of nitrate with flavin nucleotides reduced by a new chloroplasts NADH-specific diaphorase. Biochim. Biophys. Acta 162, 149-151 (1968).

Paneque, A., Del Campo, F.F., Ramirez, J.M., Losada, M. : Flavine nucleotide nitrate reductase from spinach. Biochim. Biophys. Acta 109, 79-85 (1965).

Paneque, A., Losada, M. : Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH_2 and NADPH_2 . Biochim. Biophys. Acta 128, 202-204 (1966).

Pistorius, E.K., Gewitz, H.S., Voss, H., Vennesland, B. : Reversible inactivation of nitrate reductase in Chlorella

vulgaris in vivo. *Planta* 128, 73-80 (1976).

Ries, S.K., Chmiel, U., Dilley, D.R., Filner, P. : The increase in nitrate reductase activity and protein content of plants treated with simazine. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 58, 526-532 (1967).

Rigano, C. : Quelques observations préliminaires concernant la nitrate-réductase d'Ankistrodesmus braunii. *Arch. Mikrobiol.* 70, 147-156 (1970).

Ryan, L.D., Vestling, C.S. : Rapid purification of lactate dehydrogenase from rat liver and hepatoma: a new approach. *Arch. Biochem. Biophys.* 160, 275-284 (1974).

Sawkney, S.K., Naik, M.S. : Role of light in the synthesis of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings. *Biochem. J.* 130, 475-485 (1972).

Schloemer, R.H., Garret, R.H. : Nitrate transport system in Neurospora crassa. *J. Bacteriol.* 118, 259-269 (1974).

Shen, T.C., Funkhouser, E.A., Guerrero, M.G. : NADH- and NADPH-nitrate reductase in rice seedlings. *Plant Physiol.* 58, 292-294 (1976).

Snell, E.D., Snell, C.T. : Colorimetric Methods of Analysis, p. 804, D. Van Nostrand Company, New York 1949.

Solomonson, L.P. : Purification of NADH-nitrate reductase by affinity chromatography. *Plant Physiol.* 56, 853-855 (1975).

Solomonson, L.P., Vennesland, B. : Properties of a nitrate reductase of Chlorella. Biochem. Biophys. Acta 267, 544-557 (1972).

Solomonson, L.P., Lorimer, G.H., Hall, R.L., Borchers, R., Bailey, J.L. : Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of Chlorella vulgaris. J. Biol. Chem. 250, 4120-4127 (1975).

Solomonson, L.P., Spehar, A.M. : Model for the regulation of nitrate assimilation. Nature 265, 373-375 (1977).

Sorger, G.J., Debanne, M.T., Davies, J. : Effect of nitrate on the synthesis and decay of nitrate reductase of Neurospora. Biochem. J. 140, 395-403 (1974).

Staal, G.E.J., Koster, J.F., Kamp, H., Van Milligen-Boersma, L., Veeger, C. : Human erythrocyte pyruvate kinase, its purification and some properties. Biochim. Biophys. Acta 227, 86-96 (1971).

Stachow, C.S., Sanwal, B.D. : Regulation, purification and some properties of the NADH-specific glutamate dehydrogenase of Neurospora. Biochim. Biophys. Acta 139, 294-307 (1967).

Syrett, P.J., Hipkin, C.R. : The appearance of nitrate reductase activity in nitrogen-starved cells of Ankistrodesmus braunii. Planta 111, 57-64 (1973).

- Syrett, P.J., Leftley, J.W. : Perspectives in Experimental Biology, vol. 2, p. 221, (ed. N. Sunderland), Pergamon Press. Oxford (1976).
- Thompson, S.T., Cass, K.H., Stellwager, E. : Blue Dextran-Sepharose: an affinity column for the dinucleotide fold in proteins. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 669-672 (1975).
- Travis, R., Jordan, W.R., Huffaker, R.C. : Evidence for an inactivating system of nitrate reductase in Hordeum vulgare L. that requires protein synthesis. Plant Physiol. 44, 1150-1156 (1969).
- Tweedy, J.A., Ries, S.K.: Effect of simazine on nitrate reductase activity in corn. Plant Physiol. 42, 280-282 (1967).
- Ullrich, W.R. : Die nitrat- und nitritabhängige photosynthetische O₂-Entwicklung in N₂ bei Ankistrodesmus braunii. Planta 116, 143-152 (1974).
- Ullrich-Eberius, C.I. : Beziehungen der aufnahme von nitrat, nitrit und phosphat zur photosynthetische reduktion von nitrat und nitrit und zum ATP-spiegel bei Ankistrodesmus braunii. Planta 115, 25-36 (1973).
- Ureta, T. : The role of isozymes in metabolism: A model of metabolic pathways as the basis for the biological role of isozymes. En: Current Topics in Cellular Regulation. vol 13, p. 233, (ed. B.L. Horecker, E.R. Stadtman) Academic Press. New York (1978).
- Vega, J.M., Herrera, J., Aparicio, P.J., Paneque, A., Losada, M. : Role of molybdenum in nitrate reduction by Chlorella. Plant Physiol. 48, 294-299 (1971).

Vega, J.M., Herrera, J., Relimpio, A.M., Aparicio, P.J. : NADH-nitrate reductase de Chlorella: nouvelle contribution a l'étude de sus propriétés. *Physiol. Vég.* 10, 637-652 (1972).

Vega, J.M., Kamin, H. : Spinach nitrite reductase: purification and properties of a siroheme-containing iron-sulfur enzyme. *J. Biol. Chem.* 252, 896-909 (1977).

Vennesland, B., Guerrero, M.G. : Reduction of nitrate and nitrite. En: *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series)* vol. 6 (Photosynthesis II), (ed. M. Gibbs y E. Latzko). Berlin: Springer-Verlag (en prensa).

Wallace, W. : A nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root. *Plant Physiol.* 52, 197-201 (1973).

Wallace, W. : Purification and properties of a nitrate reductase inactivating enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 341, 265-276 (1974).

Wallace, W. : Effects of a nitrate reductase inactivating enzyme and NAD(P)H on the nitrate reductase from higher plants and Neurospora. *Biochim. Biophys. Acta* 377, 239-250 (1975).

Wenger, J.I., Bernofsky, C. : Mitochondrial alcohol dehydrogenase from Saccharomyces cerevisiae. *Biochim. Biophys. Acta* 227, 479-490 (1971).

Wilcheck, M., Jacoby, W.B. : The literature on affinity

chromatography. En: *Methods in Enzymology*, vol. 34, p. 3 (ed. W.B. Jakoby, M. Wilchek) Academic Press, New York, (1974).

Wood, W.A. : Aminoacid racemases. En: *Methods in Enzymology*, vol. 2, p. 214, (ed. S.P. Colowick, N.O. Kaplan). Academic Press, New York (1955).

Yamaya, T., Ohira, K. : Purification and properties of a nitrate reductase inactivating factor from rice cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 18, 915-925 (1977).

Yates, M.G. : Nitrogen fixation. *TIBS* 1, 17-20 (1976)

Zumft, W.G., Cárdenas, J. : The inorganic biochemistry of nitrogen bioenergetic process. *Naturwissenschaften*. (en prensa).

Zumft, W.G., Paneque, A., Aparicio, P.J., Losada, M. : Structural functional role of FAD in the NADH-nitrate reducing system from Chlorella. *FEBS Letters* 9, 157-160 (1970).

Zumft, W.G., Spiller, H., Yeboah-Smith, I. : Eisenhalt und elektronendonator-spezifität der nitratreductase von Ankistrodesmus. *Planta*, 102, 228-236 (1972).

SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo integrado por los abajo firmantes
para juzgar la Tesis Doctoral

JESUS DIEZ DAPENA

Purificación hasta transparencia y estudio de
replacés del ejemplo iniciado NAD (P.H.) - what reduc-
tosa del alpe verde. Autor: desuun branni
La calificación de SOBRESACIENTE

CON LAUSE

El día 18 de septiembre

1.976

El Vocal.

El Vocal

[Signature]

[Signature]

[Signature]

El Secretario,

DOCTORAND

[Signature]

[Signature]

[Signature]

