

«EL autor del presente trabajo, doctor don Manuel Losada Villasante, catedrático de la Universidad de Sevilla y Jefe de su Departamento de Bioquímica, es hoy una de las figuras de más prestigio del ámbito universitario y de la investigación española en general.

Nacido en el pueblo sevillano de Carmona, Académico de Ciencias (1966) antes de cumplir sus cuarenta años, es también Director del Departamento de Biología Celular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. El profesor Losada Villasante viene realizando importantes tareas de investigación y entre sus descubrimientos más notables figura los de mecanismo y asimilación del nitrógeno de las plantas, por lo que recibió el Premio Nacional de Investigación «Francisco Franco», una ayuda March de medio millón de pesetas y numerosos premios extranjeros, entre ellos una subvención de 39.000 dólares de The National Institutes of Health y los Laboratorios Leppetit, italianos. Invitado por la Max-Planck no hace mucho tiempo a dar una serie de conferencias científicas sobre sus trabajos, el profesor Losada en sus distintas estancias en distintos países del mundo dejó constancia de su altísima valía.

Con una beca del Consejo Superior de Investigaciones Científicas fue enviado a Munich, para ampliar estudios en el Instituto de Botánica y luego en el de Fisiología Vegetal. Más tarde estaría en Carisberg (Dinamarca) y en 1958, en Berkeley (California), donde trabajó con el profesor Arnon en Fisiología Celular, durante dos años. Los trabajos del profesor Losada, ya desde aquel entonces, estaban en la encrucijada de la Bioquímica, Fisiología y Agricultura y otras ciencias relacionadas.

Con la colaboración presente del profesor Manuel Losada Villasante, IQ se complace y enorgullece de poder presentar en sus páginas una muestra de tan alta calidad científica, como es el trabajo que ofrecemos a nuestros lectores a continuación.»



MECANISMO MOLECULAR DE LA ASIMILACION FOTOSINTETICA DEL NITRATO EN ALGAS Y PLANTAS SUPERIORES

La vida en nuestro planeta depende de un proceso único, la fotosíntesis, que sólo las algas y las plantas verdes son capaces de realizar. Las reacciones fundamentales de la fotosíntesis consisten esencialmente en la conversión de la energía luminosa absorbida por las clorofilas y pigmentos auxiliares en energía química fisiológica bajo la forma de poder reductor, oxígeno y enlaces de fosfato ricos en energía. De manera simplificada, podríamos decir que la misión de los sistemas fotoquímicos del aparato fotosintético de las plantas es la de transformar la energía de los quantos en energía electrónica, con diferencia de potencial suficiente para romper la molécula de agua en sus dos elementos constituyentes, hidrógeno y oxígeno, y para esterificar el fosfato inorgánico.

Durante el proceso el oxígeno es eliminado como subproducto, mientras que el hidrógeno y el ATP (la moneda energética de los organismos vivos que contiene los enlaces de fosfato ricos en energía) se emplean más o menos directamente, y ya en la oscuridad, en la reducción y posterior asimilación de los compuestos inorgánicos oxidados que constituyen los nutrientes primordiales de todo organismo vegetal, a saber: anhídrido carbónico, nitrato y sulfato. La fotosíntesis no se limita, pues, a la asimilación del anhídrido carbónico, si bien este aspecto del proceso destaca, aislado entre los demás por razones de tipo histórico y de importancia cuantitativa.

El mecanismo de la asimilación fotosintética del anhídrido carbónico fue descubierto en los años cincuenta, gra-

cias, principalmente, a las investigaciones realizadas por los grupos de los profesores Calvin y Arnon en la Universidad de California, en Berkeley. En cambio, el mecanismo de la asimilación fotosintética del nitrato ha permanecido casi ignorado hasta ahora, a pesar de haber sido estudiado intensamente por fisiólogos y bioquímicos durante más de un siglo.

La significación biológica especial de la asimilación del nitrato radica no sólo en que el nitrógeno nítrico es la principal fuente de este elemento que utilizan las plantas, sino en que su reducción a amoníaco está muy estrechamente ligada a las reacciones fotosintéticas propiamente dichas. Como hemos dicho antes, el proceso en sí no depende necesariamente de la luz como fuente úni-

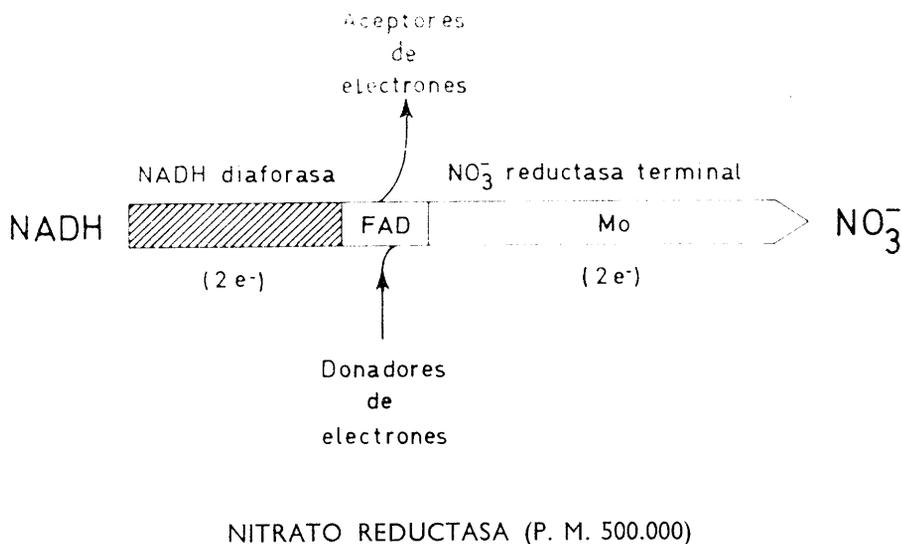


Fig. 1. Representación esquemática de la reducción enzimática del nitrato por el NADH. La reacción, que implica la transferencia de dos electrones, está catalizada por la molibdoflavoproteína NADH-nitrato reductasa (peso molecular 500.000). En ella participan secuencialmente dos actividades: primero, una NADH-diaforasa, que puede utilizar diversos aceptores de electrones para oxidar el NADH, y segundo, la nitrato reductasa propiamente dicha, o nitrato reductasa terminal, que puede utilizar flavín nucleótidos o colorantes artificiales reducidos como donadores de electrones para reducir el nitrato

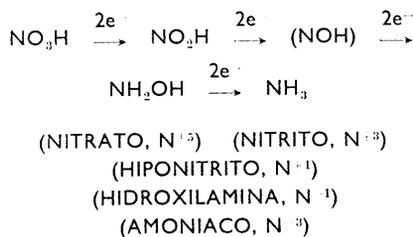
pendientes de piridín nucleótidos (o, según la nueva nomenclatura, nicotinamida adenín dinucleótidos), concluyéndose también que la asimilación del nitrato había de depender de compuestos de carbono y de enlaces de fosfato ricos en energía.

Las investigaciones realizadas en nuestro departamento durante los últimos diez años en algas y plantas superiores, a nivel celular, subcelular y molecular, han revelado el mecanismo de la reducción fotosintética del nitrato, poniendo al mismo tiempo de manifiesto que el nitrato se reduce a amoníaco en sólo dos estadios, catalizadas por dos enzimas diferentes y específicas que actúan sucesivamente. Primero se reduce el nitrato a nitrito (en una reacción que implica dos electrones) y después el nitrito a amoníaco (en una segunda reacción que implica seis electrones). En ninguna fase del proceso se requieren compuestos de carbono o ATP.



A continuación resumimos los aspectos más relevantes conseguidos en nuestro departamento en relación con la asimilación fotosintética del nitrógeno nítrico, tanto en lo que se refiere a las propiedades de las dos enzimas impli-

ca de energía, existiendo organismos (bacterias, hongos) que lo efectúan totalmente en la oscuridad a expensas de reductores de diversa composición y naturaleza. Basándose en consideraciones puramente químicas, Meyer y Schultze propusieron, a fines del siglo pasado, que la reducción biológica del nitrato a amoníaco, proceso que implica la ganancia de ocho electrones, debería tener lugar en cuatro pasos sucesivos, envolviendo cada uno de ellos dos electrones, según el esquema:



Influidos por esta hipótesis, los bioquímicos buscaron y, aparentemente, encontraron en una variedad de organismos (bacterias, hongos, algas y plantas superiores) las correspondientes enzimas, a las que denominaron nitrato reductasa, nitrito reductasa, hiponitrito reductasa e hidroxilamina reductasa, respectivamente. En general, estas enzimas fueron consideradas como metaloflavoproteínas de-

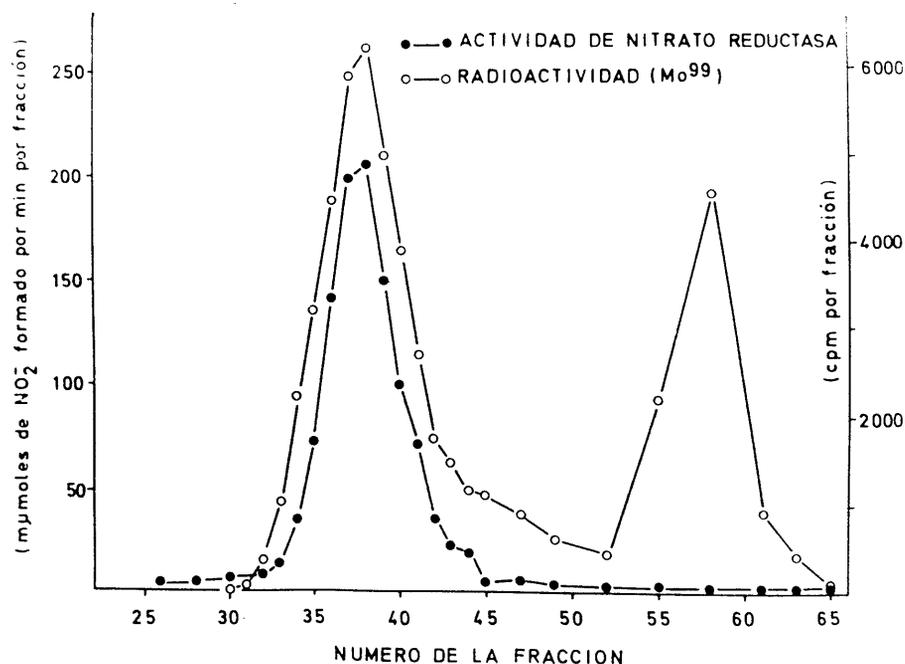


Fig. 2. Contenido en molibdeno de la nitrato reductasa. El estrecho paralelismo existente entre la radioactividad en Mo^{99} y la actividad enzimática en diversas fracciones de nitrato reductasa obtenidas por elución de una columna de gel de agarosa pone de manifiesto el componente metálico de esta proteína

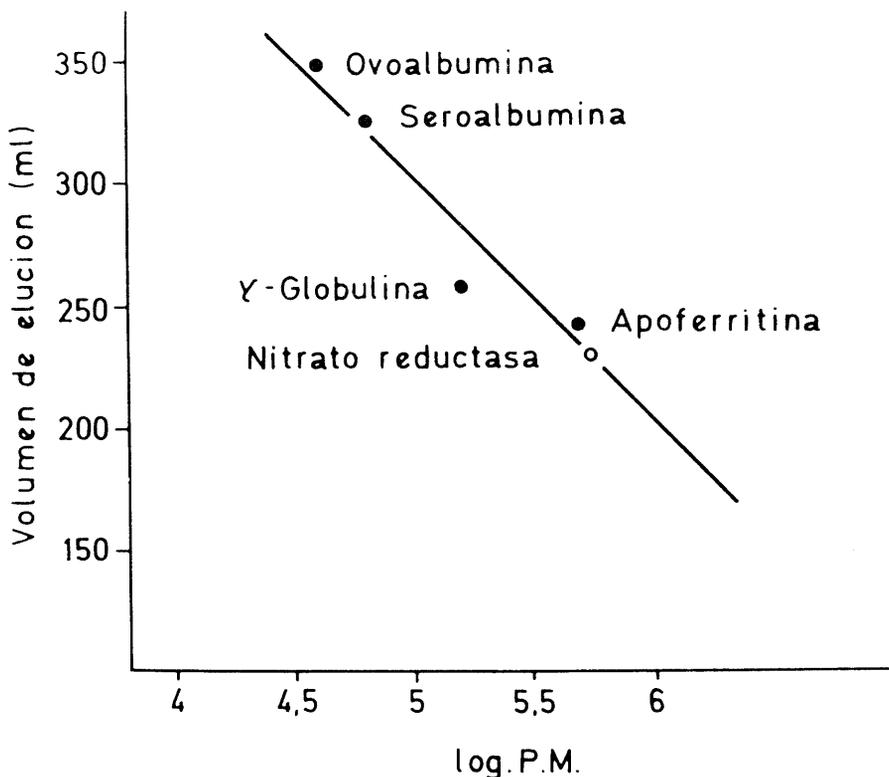


Fig. 3. Peso molecular de la nitrato reductasa (500.000) determinado por filtración en una columna de gel de agarosa calibrada con proteínas de peso molecular conocido

cadadas en el proceso, como a la reproducción del propio proceso *in vitro* utilizando un sistema reconstruido de cloroplastos.

REDUCCION DEL NITRATO A NITRITO

La enzima que cataliza la reducción del nitrato a nitrito, la nitrato reductasa, ha sido purificada varios cientos de veces utilizando, como material de partida, algas verdes (*Chlorella*) y hojas de plantas superiores (espinaca, acelga, calabaza y maíz). El procedimiento de purificación incluía, como pasos principales, preparación de un extracto crudo libre de células, tratamiento con sulfato de estreptomycin, adsorción en gel de sulfato cálcico, tratamiento con sulfato de protamina, precipitación con sulfato amónico al 40 por 100 de saturación, adsorción en alúmina γ y filtración con gel de agarosa (antes y después de la asociación de la enzima con azul dextrano).

El único donador fisiológico de electrones de la nitrato reductasa de plantas fotosintéticas es el NADH (nicotinamida adenín dinucleótido reducido). Como indica el esquema de la figura 1,

en la transferencia de electrones de NADH al nitrato, que cataliza la NADH-nitrato reductasa, participan sucesivamente dos actividades enzimáticas que, aunque no son físicamente separables, pueden ensayarse fácil e independientemente. La primera es una NADH diaforasa que puede usar diversos compuestos oxidados (tales como el citocromo c o

ciertos colorantes) como aceptores de electrones. La segunda es la nitrato reductasa propiamente dicha o nitrato reductosa terminal, que puede utilizar flavín nucleótidos (o biológicos) reducidos como donadores de electrones, y que por ello ha sido también denominada FNH₂-nitrato reductasa. Esta última enzima es precisamente la responsable del bloqueo de la asimilación del nitrato cuando se añade nitrógeno amoniacal a células que están utilizando nitrógeno nítrico, ya que, aparentemente, sufre, aparte de la represión a más largo plazo, una inmediata inactivación reversible por la acción de una enzima reguladora indirectamente activada por el amoníaco. El mecanismo molecular de la regulación del sistema reductor de nitrato es actualmente uno de los temas más fascinantes de investigación en el campo de la fisiología y bioquímica del nitrógeno inorgánico.

El p-cloromercuribenzoato y el calentamiento suave a 45° durante cinco minutos inhiben la NADH diaforasa sin afectar a la FNH₂-nitrato reductasa. En cambio, el cianuro y la azida inhiben la segunda actividad sin afectar a la primera. Todos, naturalmente, inhiben la reducción del nitrato por el NADH.

El requerimiento en FAD (flavín adenín dinucleótido) para la actividad de la NADH-nitrato reductasa (y de la NADH diaforasa) sólo se hace evidente después de la filtración con gel de agarosa, tratamiento que, aparentemente, remueve el derivado flavínico de la enzima. A este respecto es muy interesante hacer notar que sólo el FAD (entre una gran variedad de cofactores y sustratos naturales y artificiales ensayados) protege a la enzima de la inactivación térmica antes descrita. El espectro de absorción de preparaciones altamente purificadas de nitrato reductasa de diversos orígenes no muestra, sin embargo, indicación alguna de bandas de absorción de flavín nucleótidos, sino más bien una absorción generalizada a lo largo de toda la zona visible (exceptuando un hombro a

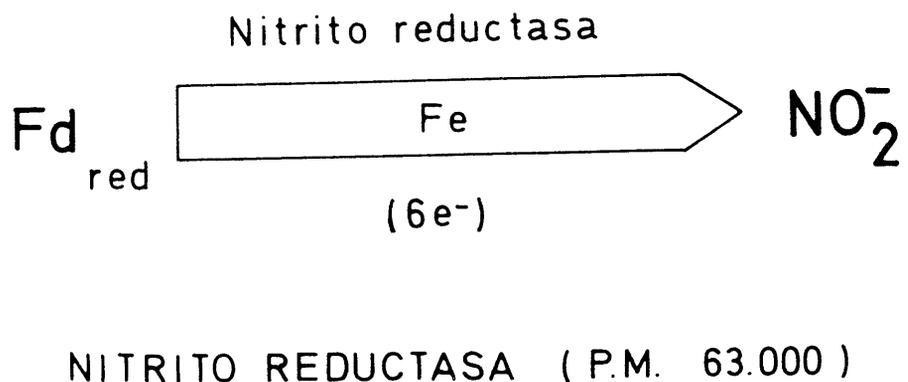


Fig. 4. Representación esquemática de la reducción enzimática del nitrito por la ferredoxina reducida. La reacción, que implica la transferencia de seis electrones, está catalizada por la ferredoxina-nitrito reductasa (peso molecular, 63.000)

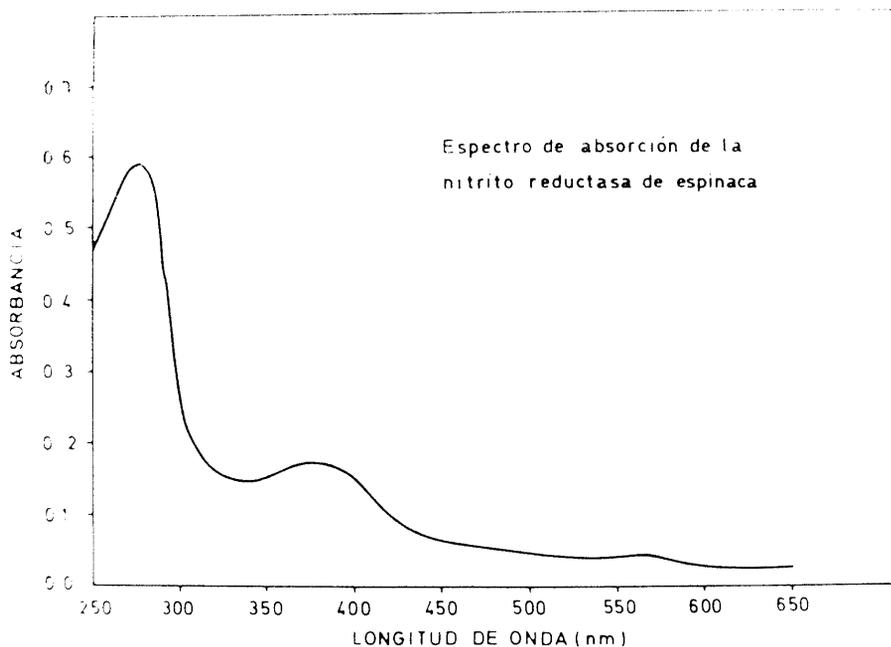


Fig. 5. Espectro de absorción de la nitrito reductasa

unos 410 nm.), completamente diferente de la típica de las flavoproteínas simples.

Suministrando molibdato marcado con Mo^{58} a células de *Chlorella* en el momento de iniciarse la de-represión de la nitrito reductasa por eliminación de amoníaco del medio se consiguió incorporar molibdeno radiactivo a la enzima sintetizada de novo. El estrecho paralelismo de la actividad enzimática y de la radiactividad a lo largo de la purificación (figura 2) ha permitido demostrar, inequívocamente, que la nitrito reductasa es una molibdo-proteína.

Utilizando la técnica de filtración en columna de gel de agarosa, calibrada con ovoalbúmina, seroalbúmina γ -globulina y apoferritina se pudo determinar que el peso molecular de la nitrito reductasa es, aproximadamente, de 500.000 (figura 3).

REDUCCION DEL NITRITO A AMONIACO

La enzima que cataliza la reducción de nitrito a amoníaco, la nitrito reductasa, ha sido purificada del orden de mil veces a través de los siguientes pasos principales: precipitación con acetona, paso por un lecho de DEAE-celulosa, cromatografía en columna de DEAE celulosa y filtración en Sephadex-G-100 (tabla 1).

El único donador fisiológico de electrones de la nitrito reductasa de plantas fotosintéticas es la ferredoxina, una proteína redox E° , pH 7, -0,4 voltios) de bajo peso molecular que contiene hierro no hemínico. La propia nitrito reductasa contiene hierro (dos átomos por molécula), según ha podido demostrarse por análisis colorimétrico y de absorción ató-

mico de la enzima purificada hasta homogeneidad por electroforesis en gel de poli-acrilamida y por incorporación de Fe^{55} al enzima, que se reprime por amoníaco, en el momento de iniciarse su síntesis de novo. La inhibición de la actividad enzimática de la nitrito reductasa por cianuro sugiere, como muestra el esquema de la figura 4, que el hierro participa en la transferencia de electrones de la ferredoxina reducida al nitrito.

El peso molecular, determinado por filtración en columna de Sephadex-G-200, calibrada con citocromo c, mioglobina, ovoalbúmina y γ -globulina es de 63.000. El espectro de absorción de la nitrito reductasa muestra, además de la banda de absorción típica de las proteínas, dos máximos a 380 nm. y 570 nm. y un hombro de 292 nm. (figura 5).

REDUCCION FOTOSINTETICA DEL NITRATO

Hace cincuenta años, el famoso bioquímico alemán Warburg realizó el des-

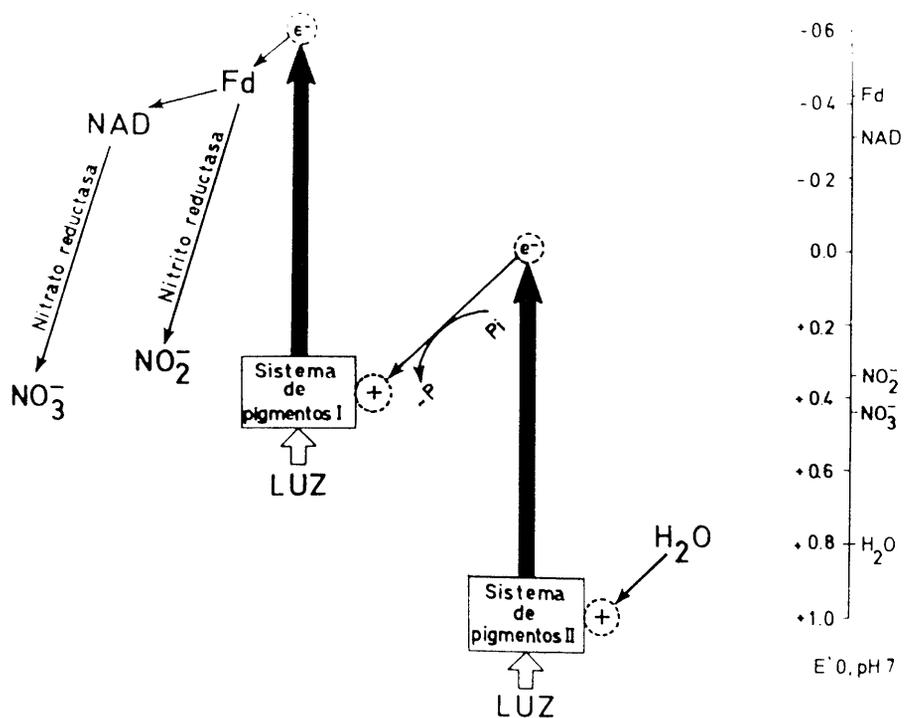


Fig. 6. Representación esquemática de la reducción fotosintética del nitrato a nitrito y de éste a amoníaco en un sistema reconstruido de cloroplasto. El donador terminal de electrones es el agua, que se oxida durante el proceso a oxígeno molecular. El transporte de electrones del agua a la ferredoxina requiere dos cuantos de luz, que son absorbidos y transformados en energía electrónica por los sistemas de pigmentos II y I, actuando en serie. Parte de la energía liberada durante la caída de electrones del sistema II al sistema I a través de la cadena de citocromos es atrapada y utilizada por el complejo fosforilante a ella acoplado para la formación de enlaces de fosfato ricos en energía. La transferencia de electrones de la ferredoxina al nitrato, pero no de la ferredoxina al nitrito, requiere la participación de la coenzima NAD. Las reacciones de reducción del nitrato a nitrito y del nitrito a amoníaco (catalizados respectivamente por las enzimas nitrito reductasa y nitrito reductasa) son en sí reacciones oscuras

TABLA 1
PURIFICACION DE LA NITRITO REDUCTASA DE ESPINACA

FRACCION	Volumen (ml.)	Proteína total (mg.)	Actividad total (unidades)	Recuperación — %	Actividad es- pecífica (uni- dades/mg. proteína)	Factor de purificación
I. Extracto crudo	980	46.640	600	100	0,013	1
II. Extracto del precipitado de acetona	132	1.674	465	70	0,277	21
III. Eluato libre de ferredoxina	120	1.410	500	76	0,356	27
IV. Eluato de la adsorción en DEAE-celulosa.	27	400	297	45	0,550	41
V. Conjunto de fracciones de la cromatografía en DEAE-celulosa	190	46	246	38	5,400	400
VI. Conjunto concentrado de fracciones de la filtración en gel de Sephadex G-100	3,6	3,2	92	14	28,400	2.100

cubrimiento fundamental en fotosíntesis de que, en la luz, las células vivas del alga *Chlorella* reducían nitrato a amoníaco a la par que producían oxígeno. Warburg, sin embargo, creyó que no sería posible reproducir fuera de la célula viva el proceso de la reducción del nitrato acoplado al desprendimiento de oxígeno, utilizando fragmentos particulares de cloroplastos ("grana") incapaces de fijar el anhídrido carbónico, ya que, según él, la asimilación fotosintética del nitrato había necesariamente de depender de la asimilación previa del anhídrido carbónico a hidrato de carbono.

Los resultados obtenidos en nuestro departamento han demostrado, sin embargo, utilizando un sistema reconstruido de cloroplastos, integrado por "gana" frescos, ferredoxina, NAD⁺ y las enzimas antes descritas, nitrato y nitrito-reductasa, que *in vitro*, y en ausencia de anhídrido carbónico, el nitrato se reduce en la luz gradualmente a nitrito y amoníaco a la par que el agua se oxida es-

tequiométricamente a oxígeno según muestra el esquema de la figura 6.

M. LOSADA y A. PANEQUE
Departamento de Bioquímica.
Instituto de Biología Celular
C. S. I. C. Facultad de Ciencias.
Universidad de Sevilla

En la realización de las investigaciones que aquí se resumen han colaborado con los autores de este artículo, por orden cronológico de su incorporación al Departamento: J. M. Ramírez, F. F. del Campo, P. J. Aparicio, L. Catalina, A. María Relimpio, J. Cárdenas, J. M. Vega, W. G. Zumft, J. Herrera y P. Sanz.