

R. 18.567

TD  
520

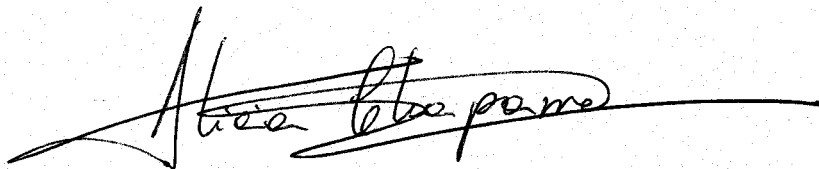
MECANISMO DE INTERCONVERSION DE LA ACTIVIDAD NADH-NITRATO  
REDUCTASA DE Chlorella fusca

UNIVERSIDAD ...  
SECRETARIA CIENCIAS

22-12-77

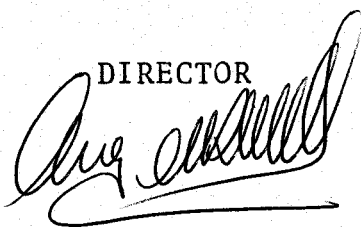
1106

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en  
Ciencias por la Licenciada Alicia Chaparro Muñoz



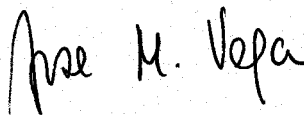
Sevilla, Diciembre 1977

DIRECTOR




Dr. Angel M. Relimpio Ferrer  
Prof. Adjunto de Bioquímica

CO-DIRECTOR



Dr. José M. Vega Piqueres  
Colaborador Científico del CSIC

PONENTE



Prof. Manuel Losada Villasante  
Catedrático de Bioquímica

A mis padres y amigos

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

En primer lugar, quiero expresar al Profesor D. Manuel Losada, de quien he recibido durante los cursos 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. Angel M. Relimpio, por su labor en la dirección de esta Tesis, y al Dr. José M. Vega, quien con constante dedicación me ha orientado y ha hecho posible la realización de este trabajo.

Deseo especialmente agradecer al Dr. José M. Maldonado, con quien me inicié en las tareas investigadoras, su paciente dedicación a mi formación científica.

Asímismo agradezco al Dr. Miguel G. Guerrero su eficaz colaboración y labor crítica.

A mis compañeros de trabajo les agradezco profundamente su amistad y colaboración, especialmente a Jesús Díez su contribución en este trabajo, a Trinidad Ortega y Francisco M. Sosa su continuo apoyo y labor crítica.

Mi agradecimiento a José Moreno, M<sup>a</sup> Josefa Pérez de León y M<sup>a</sup> Teresa Silva, que han confeccionado este trabajo y las gráficas que en él se contienen, por la amistad y apoyo que siempre he encontrado en ellos.

Por último quiero agradecer su apoyo económico a las siguientes Instituciones: Universidad de Sevilla, Ministerio de Educación y Ciencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Junta de Energía Nuclear y Philips Research Laboratories.

## INDICE

ABREVIATURAS .....	10
I. INTRODUCCION .....	11
II. MATERIALES Y METODOS .....	25
II.1. CULTIVO DE CELULAS .....	26
II.1.1. <i>Organismo empleado y condiciones standard de cultivo</i> .....	26
II.2. EXTRACCION DE METABOLITOS INTRACELULARES .....	27
II.2.1. <i>Recogida y congelación de células</i> .....	27
II.2.2. <i>Extracción ácida</i> .....	28
II.2.3. <i>Extracción alcalina</i> .....	28
II.3. ENZIMAS .....	29
II.3.1. <i>Preparación de extractos crudos</i> .....	29
II.3.1.1. <i>Recogida de células</i> .....	29
II.3.1.2. <i>Rotura de las células</i> .....	30
II.3.2. <i>Purificación parcial de la nitrato reductasa</i> .....	31
II.3.3. <i>Determinación de actividades enzimáticas</i> ..	33
II.3.3.1. <i>Actividad NADH-nitrato reductasa</i> .....	33
II.3.3.2. <i>Actividad NADH-diaforasa</i> .....	34
II.3.3.3. <i>Actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa</i> .....	35
II.3.3.4. <i>Actividad catalasa</i> .....	36

II.4.	TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS ..	37
II.4.1.	<i>Anaerobiosis en la mezcla de incubación</i> ...	37
II.4.2.	<i>Eliminación de las impurezas del NADP<sup>+</sup> comercial</i> .....	37
II.4.3.	<i>Determinación de metabolitos</i> .....	38
II.4.3.1.	<i>Determinación de adenín-nucleótidos, glucosa-6-fosfato y piruvato</i> .....	38
II.4.3.2.	<i>Determinación de piridín-nucleótidos</i> ..	41
II.4.4.	<i>Medida del crecimiento celular</i> .....	44
II.4.5.	<i>Determinación de nitrito</i> .....	44
II.4.6.	<i>Determinación de proteína</i> .....	44
II.4.7.	<i>Determinaciones espectrofotométricas</i> .....	45
II.5.	REACTIVOS Y APARATOS .....	45
II.5.1.	<i>Procedencia de los reactivos empleados</i> ....	45
II.5.2.	<i>Aparatos utilizados</i> .....	47
III.	RESULTADOS .....	49
III.1.	REGULACION DEL COMPLEJO ENZIMATICO NADH-NITRATO REDUCTASA DE <u>Chlorella fusca</u> .....	50
III.1.1.	<i>Inactivación <u>in vivo</u> de la nitrato reductasa de <u>Chlorella fusca</u></i> .....	50
III.1.2.	<i>Inactivación <u>in vitro</u> de la nitrato reductasa de <u>Chlorella fusca</u></i> .....	52
III.1.3.	<i>Cinética de la inactivación de la nitrato reductasa de <u>Chlorella fusca</u> por incubación con NAD(P)H</i> .....	55

III.1.4. *Efecto del NADP<sup>+</sup> y nitrato en la inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación del enzima con piridin-nucleótidos reducidos ..* 55

III.1.5. *Inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH y ADP .....* 58

III.1.6. *Efecto de la concentración de ADP sobre la inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH y ADP en presencia de cloruro magnésico .....* 64

III.2. CORRELACION ENTRE LA REGULACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca Y LOS NIVELES INTRACELULARES DE PIRIDIN-NUCLEOTIDOS REDUCIDOS Y ADENIN-NUCLEOTIDOS DESCARGADOS ... 68

III.2.1. *Medida de los niveles intracelulares de piridin-nucleótidos y adenin-nucleótidos .....* 68

III.2.1.1. *Efecto del método usado en la preparación de extractos sobre el contenido en piridin-nucleótidos ....* 68

III.2.2. *Inactivación de la nitrato reductasa y efecto en el nivel intracelular de piridin- y adenin-nucleótidos por adición de metilamina a células de Chlorella fusca .....* 70

III.2.3. *Inactivación de la nitrato reductasa y efecto en el nivel intracelular de piridín- y adenín-nucleótidos por adición de amoníaco a células de Chlorella fusca .....* 74

III.3. PAPEL DEL OXIGENO EN LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca ..... 78

III.3.1. *Observaciones in vitro .....* 78

III.3.1.1. Requerimiento de oxígeno para la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella fusca .. 78

III.3.1.2. Protección por catalasa o superóxido dismutasa contra la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella dependiente de NADH ..... 81

III.3.1.3. Protección por catalasa o superóxido dismutasa contra la inactivación in vitro por NADH y cianuro de la nitrato reductasa de Chlorella ..... 84

III.3.1.4. Protección por catalasa o superóxido dismutasa contra la inactivación in vitro por NADH y ADP de la nitrato reductasa de Chlorella .. 86

III.3.1.5. Efecto del FAD en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella por preincubación con NADH y ADP ..... 86



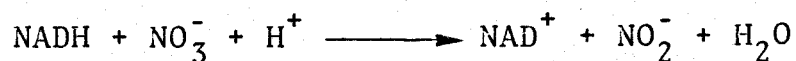
III.3.1.6. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la inactivación <u>in vitro</u> de la NADH-nitrato reductasa de <u>Chlorella</u>	89
III.3.2. <i>Observaciones a nivel fisiológico</i> .....	91
III.3.2.1. Inactivación <u>in vivo</u> de la nitrato reductasa por adición de metilamina a cultivos de <u>Chlorella fusca</u> que presentan distintos niveles intracelulares de catalasa .....	91
III.3.2.2. Inactivación <u>in vitro</u> de nitrato reductasa de <u>Chlorella fusca</u> por preincubación con NADH, utilizando preparaciones enzimáticas con distinto contenido endógeno de catalasa .....	94
III.3.2.3. Inactivación <u>in vitro</u> de nitrato reductasa de <u>Chlorella fusca</u> por preincubación con NADH y cianuro utilizando preparaciones enzimáticas con distinto contenido endógeno de catalasa	96
III.3.2.4. Inactivación <u>in vitro</u> de nitrato reductasa de <u>Chlorella fusca</u> por preincubación con FMN (reducido químicamente por ditionito), utilizando preparaciones enzimáticas con distinto contenido endógeno de catalasa .....	99
IV. DISCUSION .....	101
V. CONCLUSIONES .....	124
VI. BIBLIOGRAFIA .....	128

ABREVIATURAS

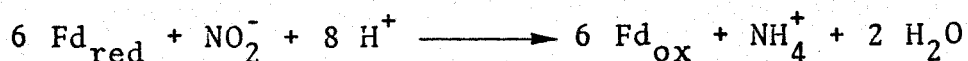
ADP	.....	Adenosina-5'-difosfato
AMP	.....	Adenosina-5'-monofosfato
ATP	.....	Adenosina-5'-trifosfato
D.O.	.....	Densidad óptica
DTE	.....	Ditioeritritol
EDTA	.....	Acido etilén-diaminotetraacético
FAD	.....	Flavín-adenín-dinucleótido
Fd	.....	Ferredoxina
FMN	.....	Flavín-adenín-mononucleótido
$\text{FNH}_2$	.....	Flavín-nucleótido reducido
<u>g</u>	.....	Aceleración de la gravedad
Glucosa-6-P	.....	Glucosa-6-fosfato
$\text{NAD(P)}^+$	.....	Nicotinamida-adenín-dinucleótido (fosfato)
$\text{NAD(P)H}$	.....	Nicotinamida-adenín-dinucleótido (fosfato) reducido
$\text{NO}_3$ Rasa	.....	Nitrato reductasa
6-P-gluconato	...	6-fosfogluconato
Tris	.....	Tri(hidroximetil)-aminometano
SOD	.....	Superóxido dismutasa
$\phi$	.....	Diámetro

## I. INTRODUCCION

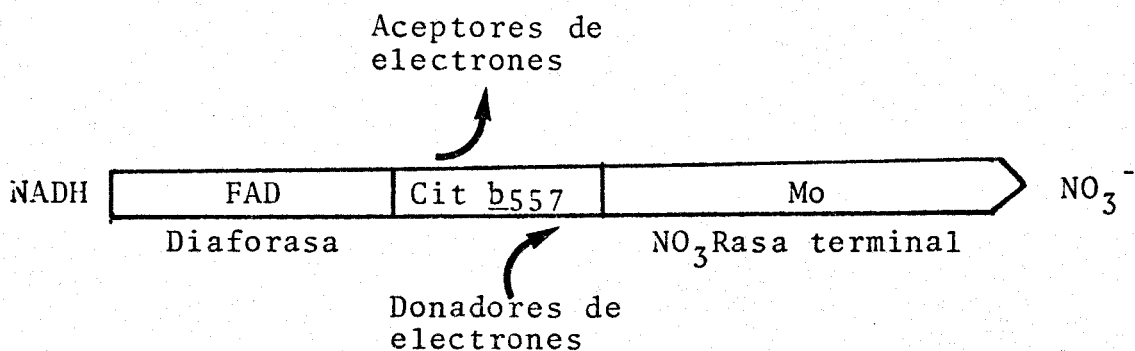
La mayoría de las plantas superiores y algas verdes en su ambiente natural utilizan el nitrato como fuente inmediata de nitrógeno. Para ello el nitrato tiene que convertirse en amonio antes de incorporarse a esqueletos carbonados para dar origen a los diversos componentes nitrogenados de las células (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.). La capacidad de usar nitrato como fuente de nitrógeno la comparten con las plantas superiores y las algas, muchos hongos, levaduras y bacterias. Puesto que en el nitrato, el nitrógeno tiene una carga +5 y en el amonio de -3, se requiere, para convertir el nitrato en amoniaco, una reducción que lleve consigo la transferencia global de 8 electrones. En los organismos fotosintéticos esto ocurre en dos etapas: primera, el nitrato se reduce a nitrito, reacción que conlleva la transferencia de 2 electrones y está catalizada por el complejo enzimático NADH-nitrato reductasa (E.C.1.6.6.1.):



Seguidamente, el nitrito se reduce hasta amoniaco, reacción que supone una transferencia de 6 electrones y está catalizada por el enzima ferredoxina-nitrito reductasa (E.C.1.7.7.1.):



En la transferencia de electrones desde el NADH al nitrato participan secuencialmente dos actividades, que aunque no se han podido separar físicamente, pueden ensayarse independientemente. La primera actividad es una NADH-diaforasa, dependiente de FAD, que transfiere los electrones desde el NADH, bien a la segunda mitad del complejo, o a una variedad de compuestos oxidados del tipo citocromo c, ferricianuro, 2,6-diclorofenol-indofenol, etc. (64,66,103) . La segunda mitad del complejo es una molibdo protefna, la nitrato reductasa propiamente dicha y que utiliza flavin-nucleótidos o viológenos reducidos químicamente con ditionito, como donador de electrones para reducir el nitrato a nitrito, por ello también se le denomina FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa(42). El complejo enzimático NADH-nitrato reductasa de organismos fotosintéticos también contiene citocromo b<sub>557</sub> como grupo prostético (24,59,80) y la secuencia que siguen los electrones desde el NADH al nitrato puede esquematizarse así:



Estas dos actividades (NADH-diaforasa y  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa) son diferentemente afectadas por tratamientos selectivos e 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-cloromercuribenzoato (pCMB), que reacciona con los grupos sulfhidrilos (-SH) de la proteína. Ambos procesos pueden prevenirse de una forma específica por la presencia del grupo prostético (FAD) de la diaforasa o del donador fisiológico de electrones del enzima (NADH) respectivamente (40). Por otra parte la nitrato reductasa terminal, que es notablemente resistente al tratamiento térmico y al pCMB, 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 (95).

El enzima del alga verde Chlorella vulgaris se ha purificado hasta homogeneidad por un sencillo método, que incluye como etapa principal una cromatografía de afinidad

en una columna de azul-dextrano sefarosa (78). El enzima contiene 3 subunidades y 2 moléculas de cada uno de sus grupos prostéticos que son FAD, citocromo  $b_{557}$  y molibdeno (80). Aun cuando la nitrato reductasa de Chlorella fusca no se ha logrado todavía purificar hasta homogeneidad, se sabe que es un complejo enzimático (P.M. 500.000) que también contiene FAD (103); molibdeno (94) y citocromo  $b_{557}$  (M.G. Guerrero, comunicación personal) como grupos prostéticos.

Otras nitrato reductasas han sido purificadas hasta homogeneidad, tal es el caso del enzima del hongo Neurospora crassa (63) y de la levadura Rhodotorula glutinis (23). Preparaciones altamente purificadas de nitrato reductasa de espinaca (24,59) y del alga verde Ankistrodesmus braunii también se han obtenido (3,15). En todos los casos el análisis cualitativo de sus grupos prostéticos es similar a los anteriormente indicados para el enzima de Chlorella fusca.

Beevers y Hageman (10), han concluido que el enzima limitante en la asimilación de nitrato es la nitrato reductasa. Nitrito y amoniaco están normalmente presentes en las células vegetales en pequeñas cantidades, salvo en circunstancias excepcionales; sin embargo la concentración in-

tracelular 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<sub>2</sub>, temperatura y fuente de nitrógeno (10,39,57). En general estos enzimas presentan máximo nivel cuando las células se crecen con nitrato como fuente única de nitrógeno y su nivel es prácticamente nulo en células creciendo con amonio.

El complejo nitrato reductasa del alga verde Chlorella fusca es un enzima adaptativo, que se reprime por amonio (producto final de la reducción asimilatoria de nitrato) incluso en presencia de nitrato. Su síntesis depende de la adición al cultivo de una adecuada fuente de nitrógeno, siendo el nitrato el más efectivo. En ausencia de fuente de nitrógeno no se forma una significativa cantidad de enzima, lo que indica que el nitrato no es un inductor esencial para la síntesis de novo del enzima (94). Por otra parte esta síntesis



se inhibe por la adición de cicloheximida (45). Similares resultados se han conseguido para el enzima de otras algas verdes como Chlamydomonas reinhardi (28) y Ankistrodesmus braunii (16).

En cultivos sincrónicos de Chlorella (30, 87) creciendo en periodos circadianos de luz y oscuridad, se ha observado un marcado incremento en el nivel de nitrato y nitrito reductasa al comienzo del período luminoso, alcanzando un máximo, para descender a un nivel mínimo hacia el final de la fase oscura. La síntesis de novo de los enzimas está implicada en el proceso, ya que estas oscilaciones son sensibles a la actidiona.

Poco se sabe acerca del mecanismo de control de la síntesis de nitrato reductasa a niveles de transcripción y transducción. Por otra parte una serie de compuestos no muy claramente relacionados a priori con la asimilación de nitrato, afectan la síntesis de nitrato reductasa en ciertas especies de plantas o algas; tal es el caso del herbicida simazina que utilizado a concentraciones subtóxicas causa un sensible incremento en el nivel de nitrato reductasa en guisantes, arroz, maíz, etc., y por ello se ha empleado pa-

ra incrementar el contenido proteico de alimentos vegetales (71,72,90).

Travis y col. (89) han mostrado que la cicloheximida previene la caída normal de nitrato reductasa que tiene lugar en hojas de cebada cuando se ponen en la oscuridad. Esto sugiere la participación de una protefina en la degradación de nitrato reductasa. Se ha aislado una protefina a partir de semillas de maiz (98,99), que inactiva nitrato reductasas. Este enzima actúa sobre la nitrato reductasa de Neurospora y plantas superiores, pero no sobre el enzima de origen bacteriano. Parece ser que se trata de un enzima proteolítico que particularmente ataca a la mitad diaforasa de la nitrato reductasa (100). En Neurospora, la presencia de nitrato en el medio de cultivo decrece la velocidad de degradación in vivo de la nitrato reductasa (82).

Se han hecho interesantes estudios acerca de la utilización de nitrato, y en principio parecía existir una estrecha relación entre el desarrollo de actividad transportadora de nitrato y la correspondiente a la nitrato reductasa. Sin embargo, se ha mostrado recientemente que existe transporte de nitrato en células que no tienen actividad ni-

trato reductasa (26, 70, 73) lo que parece indicar que el sistema de transporte de nitrato no depende de la presencia de nitrato reductasa activa.

La utilización de nitrato se ha estudiado ampliamente en las algas verdes Chlorella fusca y Chlamydomonas reinhardi ( 57, 85). Estas células muestran una fuerte estimulación en la utilización de nitrato por la luz y el  $\text{CO}_2$ . Los carbohidratos pueden sustituir al  $\text{CO}_2$  en su efecto estimulante, indicando que el efecto del  $\text{CO}_2$  se debe a su conversión en carbohidratos. En presencia de amonio la utilización de nitrato por el alga cesa inmediatamente, esto podría deberse a que el amonio afectara al sistema de transporte de nitrato o a la nitrato reductasa misma ( 57, 86). Numerosos equipos de investigación se han interesado en este tema y, al parecer, en cortos periodos de tiempo el amonio actúa por una parte sobre el sistema de transporte de nitrato, que virtualmente es el primer punto de control en la utilización de nitrato por algas verdes ( 67,85 ) y plantas superiores (11). Por otro lado, como se indica a continuación, la actividad nitrato reductasa es otro punto clave -sobre el que el amonio también ejerce una rápida acción- donde radica una sugestiva regulación de la utilización de nitrato en los organismos que lo pueden

asimilar.

La interconversión del enzima nitrato reductasa ha sido extensamente estudiada en nuestro laboratorio, a niveles celular, subcelular y molecular, empleando las algas verdes Chlorella fusca y Chlamydomonas reinhardi (39,40,41).

Losada y col. (38) observaron por primera vez que la adición de amonio a células de Chlorella fusca, creciendo en la luz y con nitrato, produce una rápida inactivación de la segunda mitad del complejo NADH-nitrato reductasa (i.e. FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa). La subsecuente eliminación de amonio del medio de cultivo lleva consigo la reactivación del enzima. Por otra parte un efecto semejante al observado con el amonio presentan el arseniato o la metilamina, cuando se añaden a un cultivo de células de Chlorella fusca creciendo en la luz y CO<sub>2</sub> con nitrato como fuente de nitrógeno (41). La característica común del amonio, arseniato y metilamina, donde aparentemente incide la base de su acción inactivante, es que estas tres sustancias son desacoplantes de la fotofosforilación no cíclica (22,43).

In vitro, la inactivación de la mitad terminal del complejo NADH-nitrato reductasa requiere piridín-nucleóti-

dos reducidos (56) y es potenciada por ADP (51). El enzima inactivado in vivo o in vitro puede en todos los casos reactivarse in vitro por oxidación a 0°C con ferricianuro (41). El nitrato podría ser el sustituto fisiológico del ferricianuro, que actuara in vivo como agente reactivante del enzima pero no se han conseguido resultados claramente concluyentes al respecto (56).

Aparentemente, el amoniaco (y también el arseniato o la metilamina), actuando como un desacoplante de la fotofosforilación no cíclica, origina un incremento en el nivel intracelular de los piridín-nucleótidos reducidos y de los nucleótidos descargados de adenina que producen la inactivación de la nitrato reductasa (41). Sin embargo, no se había hecho hasta ahora una medida experimental del posible cambio de los niveles intracelulares de dichos metabolitos, en respuesta a los tratamientos de inactivación in vivo de la nitrato reductasa antes mencionados, que sin lugar a dudas, consolidaría el mecanismo de inactivación in vivo de la nitrato reductasa de algas verdes propuesto.

Por otro lado, Vennessland y col. han estudiado la inactivación reversible de la nitrato reductasa de Chlorella

lla vulgaris, tanto in vivo como in vitro. Al igual que en Chlorella fusca, la adición de amonio a células creciendo a la luz con CO<sub>2</sub> y nitrato origina la inactivación del enzima, que posteriormente ellos identificaron como un complejo del enzima reducido con cianuro (19,37, 77,79). Este grupo propone por tanto, un sistema de regulación metabólica de la nitrato reductasa basado en la inactivación reversible por cianuro del enzima reducido (37).

Es interesante señalar aquí que Vega y col. (95) mostraron que el cianuro, a bajas concentraciones inactiva in vitro eficazmente a la mitad terminal del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca, cuando el enzima se haya 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.

A la luz de estas hipótesis discrepantes nos planteamos un estudio a fondo acerca del mecanismo de inactivación in vivo de la nitrato reductasa del alga verde Chlorella fusca. Los resultados que se presentan en este trabajo suponen una importante contribución al conocimiento del mecanismo de

interconversión del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca, y pueden resumirse en tres puntos:

1. Un estudio detallado de las condiciones bajo las que el ADP ejerce su efecto potenciador en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa.
2. Medida del nivel intracelular de piridín-nucleótidos reducidos y nucleótidos descargados de adenina que muestran, de una manera directa, que cuando la nitrato reductasa de Chlorella fusca se inactiva por adición de amonio o metilamina a células creciendo en la luz con nitrato, los niveles intracelulares de NADH y NADPH suben, mientras que baja sensiblemente la carga energética celular. Estos datos suponen una evidencia experimental decisiva que indica que la hipótesis acerca del mecanismo de inactivación de la nitrato reductasa propuesta por el grupo de Sevilla puede presentar una validez más significativa que aquella propuesta por el grupo de Berlin.
3. Por primera vez se muestra que el oxígeno juega un papel esencial en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella fusca, cuando se preincuba con NADH, con NADH más ADP, o con NADH más cianuro. Aparentemente

este tipo de inactivación del enzima está mediada por radicales, superóxido y peróxido, que se forman probablemente al interaccionar el enzima reducido con el oxígeno molecular. Incluimos también interesantes estudios in vivo que sugieren que estas observaciones in vitro puedan tener significancia fisiológica, y que por tanto el oxígeno tenga una importante función en el mecanismo de interconversión de la nitrato reductasa.

Parte de este trabajo se ha publicado en revistas (12) o se ha presentado en forma de resumen en Congresos Científicos (13).



## 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 unicelular Chlorella fusca Shihira et Krauss (C. pyrenoidosa Chick) 211-15, obtenida de la colección Pringsheim de Göttingen (Alemania).

El medio de cultivo era esencialmente igual al descrito por Kessler (34) y contenía los siguientes compuestos a las concentraciones que se indican:  $\text{NO}_3\text{K}$ , 8 mM;  $\text{ClNa}$ , 8 mM;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , 10 mM;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 10 mM;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 1 mM;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 0,1 mM;  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , 20  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Cl}_2\text{Mn}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , 8  $\mu\text{M}$ ;  $\text{SO}_4\text{Zn}$ , 0,7  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MoO}_4\text{Na}_2$ , 0,1  $\mu\text{M}$  y EDTA, 34  $\mu\text{M}$ .

El medio de cultivo se usó sin esterilizar ya que, al no tener fuente de carbono y emplear una gran masa de células como inóculo, la contaminación era mínima, como se comprobó por examen microscópico del cultivo.

Las células se cultivaron en la luz a 25°C en tubos de 250 ml o bien, cuando fue necesario obtener mayor masa de células, en frascos de Roux de 1 l, por los que se hi-

zo pasar una corriente continua de aire conteniendo un 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> que servía como fuente de carbono. La iluminación se hizo con tubos fluorescentes de luz blanca que proporcionaban 1.200 lux en la superficie del tubo de cultivo.

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

## II.2. EXTRACCION DE METABOLITOS INTRACELULARES

### II.2.1. *Recogida y congelación de células*

Una vez terminado el experimento correspondiente y con objeto de medir metabolitos intracelulares, las células se recogieron rápidamente y se enfriaron con nitrógeno líquido con objeto de parar lo antes posible el metabolismo celular. La filtración de células se hizo con ayuda de una bomba de vacío, utilizando filtros de membrana (millipore, 45  $\mu$  de diámetro). Inmediatamente después, las células se enfriaron con nitrógeno líquido y una vez congeladas se pasaron a tubos de poliestireno. En todos estos pasos, las algas se mantuvieron a la luz y nunca transcurrieron más de 10 seg desde que las células se empezaron a filtrar hasta que fueron congeladas.

### II.2.2. *Extracción ácida*

Para la extracción de adenín-nucleótidos, piruvato, glucosa-6-fosfato y las formas oxidadas de los nucleótidos de nicotinamida, los tubos conteniendo las células congeladas se colocaron en un baño de hielo y sal a  $-15^{\circ}\text{C}$  y se les añadió, previamente enfriados a la misma temperatura, 5 ml de  $\text{ClO}_4\text{H}$  1 N más 0,5 ml de Tris 1 M por cada g de peso fresco de células. Las muestras se mantuvieron en el baño durante 30 min, agitándolas fuertemente de vez en cuando, con objeto de que el ácido penetrara bien en la masa de células. En estas condiciones se destruyeron los piridín-nucleótidos reducidos (47, 48). A continuación las muestras se congelaron y descongelaron dos veces y después se centrifugaron a  $30.000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , eliminando así las partículas celulares y proteínas desnaturalizadas. Los sobrenadantes se neutralizaron en frío hasta un pH 6,5-7,0 con 0,5 ml de KOH 10 M. Después de centrifugar a  $5.000 \times g$ , durante 5 min, se separó el  $\text{ClO}_4\text{K}$  precipitado e inmediatamente se analizaron en los sobrenadantes correspondientes los metabolitos anteriormente citados.

### II.2.3. *Extracción alcalina*

La extracción de los nucleótidos de nicotinamida

en estado reducido se realizó mediante un tratamiento alcalino. Los tubos con las algas congeladas se llevaron a un baño con hielo y sal a  $-15^{\circ}\text{C}$ , añadiendo a cada uno de ellos 4 ml de KOH 0,1 M por g de peso fresco de células. Después de 30 min con agitación ocasional, se sacaron los tubos del baño y fueron introducidos en otro de agua a  $90^{\circ}\text{C}$  durante 90 seg. Las muestras se enfriaron rápidamente a  $0^{\circ}\text{C}$  y se ajustaron hasta pH 10 aproximadamente, con 0,4 ml de  $\text{CO}_3\text{HK}$  2 M (48). Las partículas celulares y proteínas desnaturalizadas se eliminaron de las muestras por centrifugación a  $30.000 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y a continuación se valoraron los contenidos de piridín-nucleótidos reducidos en los sobrenadantes.

## II.3. ENZIMAS

### II.3.1. *Preparación de extractos crudos*

#### II.3.1.1. Recogida de células

Las algas, en fase exponencial de crecimiento, se separaron del medio de cultivo, por centrifugación a  $13.000 \times g$  durante 5 min. Las células se resuspendieron en agua destilada y a continuación se sometieron a una nueva centrifugación a  $27.000 \times g$  durante 10 min para eliminar los restos del medio de cultivo.

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

#### II.3.1.2. Rotura de las células

Las células recogidas se mezclaron con perlas de vidrio de 0,25-0,30 mm  $\phi$  y una solución de Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5, 10  $\mu$ M en FAD. Por cada 10 g de células se añadieron 50 ml de perlas y 8 ml de tampón. Una vez preparada la pasta homogénea se sometió a vibración a alta velocidad a 0°C durante 6 min. La preparación de células rotas se lavó después con el tampón anteriormente indicado (70 ml por cada 10 g de células).

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

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 célula. El material roto se extrajo con tampón Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5, (si el extracto crudo se destinaba a la purificación, el tampón usado era 10  $\mu$ M en

FAD), en la proporción de 8 ml de tampón por cada g de peso fresco de células. El material extraído se centrifugó a 27.000 x g durante 15 min. El sobrenadante constituyó el extracto crudo para la purificación de la nitrato reductasa o la determinación de las actividades enzimáticas.

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

### II.3.2. *Purificación parcial de la nitrato reductasa*

La nitrato reductasa de Chlorella fusca se ha purificado siguiendo el procedimiento ya descrito para este alga (5, 55) con algunas modificaciones. La purificación se realizó a baja temperatura (4°C) e incluía los siguientes pasos:

1) Tratamiento con sulfato de estreptomicina: Por cada 10 ml del extracto libre de células obtenido como se indica en el apartado anterior, 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 15min y se

recogió el sobrenadante.

2) Adsorción en gel de fosfato cálcico: A cada 5 ml del sobrenadante anterior se le añadió, gota a gota y con agitación ocasional, 2 ml de una suspensión de gel de fosfato cálcico de 10 mg/ml, preparado como describe Wood (102). Después de 10 min, la mezcla se centrifugó a 4.000 x g durante 5 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con pirofosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), 10 µM en FAD, añadiendo poco a poco un volumen igual al de gel de fosfato utilizado. Se mantuvo la suspensión durante 10 min con agitación ocasional, tras lo cual se centrifugó a 27.000 x g durante 15 min, recogiendo el sobrenadante.

3) Ultracentrifugación: El sobrenadante anterior se sometió, seguidamente, a una centrifugación a 130.000 x g, durante 120 min. Se desechó el precipitado resultante, de color verde oscuro.

4) Precipitación con sulfato amónico: A continuación se añadió al sobrenadante obtenido en el paso anterior, sulfato amónico sólido hasta alcanzar un 50% de saturación. La mezcla se mantuvo 15 min con agitación ocasional, y después se centrifugó a 27.000 x g durante 15 min, redisolviéndose lue



go el precipitado en 1-2 ml de una disolución de tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, 10  $\mu$ 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 (1,8 cm  $\phi$  x 8,0 cm de altura) equilibrada con el tampón de Tris-ClH descrito anteriormente. Se recogieron de 2-3 ml del eluato, que contenía la nitrato reductasa libre de sales, y constituyó la preparación II, utilizada en algunos de los experimentos que se describen más adelante. La preparación I se obtuvo de igual forma pero omitiendo la ultracentrifugación.

Los experimentos de inactivación in vitro de la nitrato reductasa, se hicieron con preparaciones obtenidas el mismo día.

### II.3.3. *Determinación de actividades enzimáticas*

#### II.3.3.1. Actividad NADH-nitrato reductasa

Esta actividad se determinó por dos procedimientos. El primero consistía en seguir espectrofotométricamente la desaparición de NADH que acompaña estequiométricamente a la reducción de nitrato (25). En cubetas de espectro-

fotómetro se prepararon las mezclas de reacción que contenían, además de la preparación enzimática, 100  $\mu$ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 10  $\mu$ moles de  $\text{NO}_3\text{K}$  y 0,15  $\mu$ moles de NADH en un volumen final de 1 ml. Se siguió primero la desaparición de NADH 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 otro procedimiento empleado consistía en medir colorimétricamente el nitrito aparecido como consecuencia de la reducción del nitrato (66). La reacción se llevó a cabo en tubos de ensayo de 10 ml. La mezcla de reacción contenía además de la preparación enzimática 100  $\mu$ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 10  $\mu$ moles de  $\text{NO}_3\text{K}$  y 0,3  $\mu$ moles de NADH 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 (76), según se describe más adelante.

#### II.3.3.2. Actividad NADH-diaforasa

Se determinó siguiendo espectrofotométricamente el cambio de color que acompaña a la reducción del citocromo c (6).

La mezcla de reacción contenía, además de la preparación enzimática, 200  $\mu$ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 0,12  $\mu$ moles de citocromo c y 0,3  $\mu$ moles de NADH en un volumen final de 2 ml. La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro a temperatura ambiente.

#### II.3.3.3. Actividad FNH<sub>2</sub>-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 químicamente reducido con S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> (65). La mezcla de reacción para la determinación de esta actividad incluía, en un volumen final de 1 ml, además de la preparación enzimática, 100  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; 10  $\mu$ moles de NO<sub>3</sub>K; 0,1  $\mu$ moles de FMN y 0,1 ml de una solución que contenía 46  $\mu$ moles de S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> y 92  $\mu$ moles de CO<sub>3</sub>HNa por ml. La mezcla de reacción se incubó 10 min a 30°C, al cabo de este tiempo se detuvo la reacción agitando vigorosamente hasta que todo el ditionito quedó oxidado con lo que reapareció el color amarillo intenso del FMN. Posteriormente se determinó el nitrito aparecido (76), como se describe más adelante.

La unidad de actividad enzimática NADH-nitrato reductasa, NADH-diaforasa y FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se define como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADH ó la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de nitrito por min según los casos.

#### II.3.3.4. Actividad catalasa

La actividad catalasa se determinó espectrofotométricamente siguiendo el cambio de absorbancia a 240 nm que tiene lugar al incubar la preparación enzimática con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

El procedimiento de ensayo está basado en el descrito por Orr (60) con algunas modificaciones. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: 53  $\mu\text{moles}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una disolución de Tris-ClH 0,01 M, pH 7,0, y la preparación enzimática. La lectura se hizo a 240 nm frente a un blanco con todos los reactivos excepto el sustrato.

La reacción se llevó a cabo en cubetas de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz, a temperatura ambiente.

Para medir la velocidad de la reacción se considera la pendiente inicial (primeros 10 seg) y la actividad se

expresa por el cambio de la absorbancia por min. Bajo estas condiciones, 80 unidades de catalasa comercial produjeron, por min, un cambio de densidad óptica, a 240 nm, de 1,512, y éste fue proporcional a la cantidad de enzima añadido.

## II.4. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

### II.4.1. *Anaerobiosis en la mezcla de incubación*

En aquellos casos en que fue necesario hacer tratamientos anaeróbicos, la solución correspondiente se puso en tubos de 1 x 4,5 cm que se cierran con tapones de goma. El oxígeno se elimina de acuerdo con el siguiente trata - miento: se hace el vacío durante 1 min y se inyecta argón, agitando después ligeramente durante 30 seg. El proceso se repite unas tres veces con objeto de eliminar las trazas de oxígeno.

### II.4.2. *Eliminación de las impurezas del NADP<sup>+</sup> comercial*

Con este fin se utilizó el método descrito por Guerrero y col. (74) para la separación de piridín-nucleó tidos y nitrito.

Se empleó para ello una columna de DEAE-celulosa de 1,1 cm  $\phi$  y 9,0 cm de altura equilibrada con Tris-ClH, pH 8,0, sobre la que se absorbió una solución concentrada de NADP<sup>+</sup> comercial. Posteriormente, el contenido de la columna se lavó varias veces con el mismo tampón, y a continuación el NADP<sup>+</sup> fue eluido con Tris-ClH 100 mM, pH 8,0, 50 mM en ClNa. Se obtuvo así el NADP<sup>+</sup> libre de productos contaminantes, especialmente de nitrato, que podían enmascarar la acción del NADP<sup>+</sup> en los experimentos en que fué utilizado.

La presencia de NADP<sup>+</sup> en las fracciones recogidas se detectó midiendo su absorbancia a 260 nm, conservando sólo las de mayor contenido. Puesto que los piridín-nucleótidos oxidados son más estables a pH bajo, las soluciones de NADP<sup>+</sup> se ajustaron con ClH diluido, hasta pH 4,0. Se determinó entonces las concentraciones de las soluciones y se mantuvieron a -20°C hasta el momento de utilizarlas.

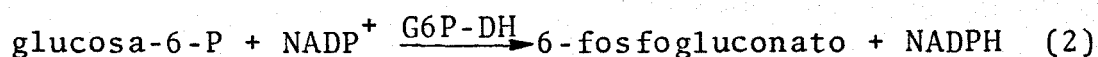
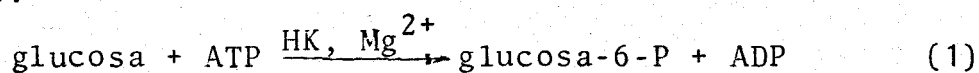
#### II.4.3. *Determinación de metabolitos*

##### II.4.3.1. Determinación de adenín-nucleótidos, glucosa-6-fosfato y piruvato

Los niveles de ATP, ADP, AMP, glucosa-6-fosfato

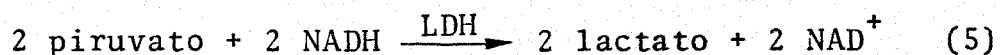
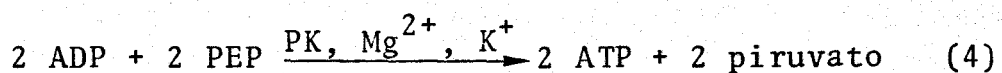
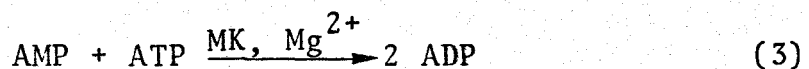
y piruvato se determinaron espectrofotométricamente según métodos enzimáticos previamente descritos (1,35).

Glucosa-6-fosfato y ATP se determinaron sucesivamente en la misma mezcla de reacción, que incluía en un volumen final de 2 ml: 200  $\mu$ moles de tampón clorhidrato de trietanolamina, pH 7,6; 1  $\mu$ mol DTE; 4  $\mu$ moles de  $Cl_2Mg$ ; 5  $\mu$ moles de glucosa; 1  $\mu$ mol de  $NADP^+$  y una alícuota del extracto ácido. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



La glucosa-6-fosfato se determinó por adición a la mezcla de reacción de 10  $\mu$ l (7,0 unidades) de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH), midiendo el incremento neto de densidad óptica a 340 nm, el cual es directamente proporcional a la cantidad de glucosa-6-P como se indica en la reacción (2). Una vez concluida la reacción anterior, se determinó el ATP presente en el extracto ácido, por adición a la misma mezcla de reacción de 10  $\mu$ l (4,2 unidades) de hexoquinasa (HK), midiendo el nuevo incremento en la absorción a 340 nm que tuvo lugar como consecuencia de las reacciones (1) y (2).

Las determinaciones de piruvato, ADP y AMP se hicieron sucesivamente en la misma mezcla de reacción que incluía en un volumen final de 2 ml: 200  $\mu$ moles de tampón clorhidrato de trietanolamina, pH 7,6; 1,0  $\mu$ mol de DTE; 4  $\mu$ moles de  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ; 200  $\mu$ moles de  $\text{ClK}$ ; 2  $\mu$ moles de EDTA; 4  $\mu$ moles de fosfoenolpiruvato (PEP); 0,1  $\mu$ mol de ATP; 0,3  $\mu$ moles de NADH y una alícuota del extracto ácido. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



El piruvato se determinó por adición a la mezcla de reacción de 20  $\mu$ l (5,0 unidades) de láctico deshidrogenasa (LDH) midiendo la disminución neta de densidad óptica a 340 nm que es proporcional a la cantidad de piruvato según se indica en la reacción (5). Una vez terminada la reacción anterior (se estabiliza la absorción a 340 nm de la mezcla de reacción), se determina la concentración de ADP por adición a la misma mezcla de reacción de 5  $\mu$ l (12 unidades) de piruvato-quinasa (PK), y medimos de nuevo la disminución global de la absorción a 340 nm que tiene lugar



como consecuencia de las reacciones (4) y (5). Cuando se terminan estas reacciones, se determina la concentración de AMP por adición a la misma mezcla de reacción de 20  $\mu$ l (4,5 unidades) de mioquinasa (MK), midiendo de nuevo la disminución global de la densidad óptica a 340 nm que se produce como consecuencia de las reacciones (3), (4) y (5) que tienen lugar en la mezcla de reacción.

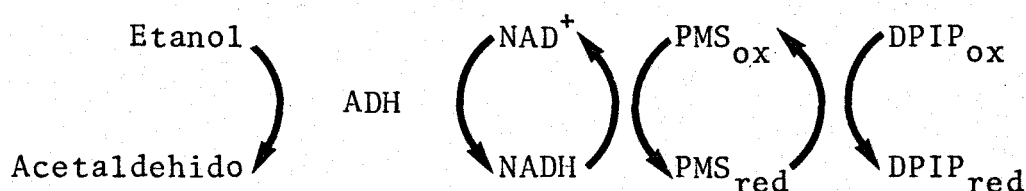
En todos los casos, las lecturas de absorbancia se hicieron a temperatura ambiente frente a un blanco que contenía todos los reactivos excepto la alícuota de extracto ácido.

#### II.4.3.2. Determinación de piridín-nucleótidos

Los piridín-nucleótidos reducidos (NADH o NADPH) se determinaron en el extracto alcalino por una reacción cíclica de óxido-reducción (75).

El NADH reduce químicamente al 2,6-diclorofenol-indofenol oxidado (DPIP<sub>ox</sub>), en presencia de fenazina metasulfato (PMS). Por otra parte, el NAD<sup>+</sup> que se forma durante la reacción química, pasa inmediatamente a NADH por la acción del sistema, etanol-alcohol deshidrogenasa (ADH),

de forma que la concentración de NADH puede considerarse prácticamente constante durante la reacción, la cual puede seguirse espectrofotométricamente a 600 nm por desaparición del color azul característico del  $\text{DPIP}_{\text{ox}}$ , ya que éste se está reduciendo. La velocidad de reducción del  $\text{DPIP}_{\text{ox}}$  es directamente proporcional a la cantidad de NADH en la mezcla de reacción. Las reacciones están acopladas de la siguiente forma:

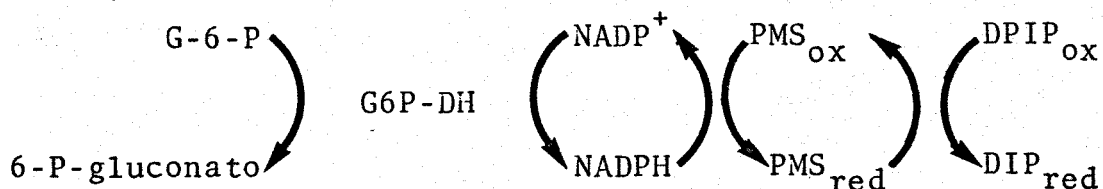


La mezcla de reacción en este caso incluye: en un volumen final de 2 ml: 200  $\mu\text{moles}$  de tampón glicil-glicina, pH 9,0; 425  $\mu\text{moles}$  de etanol; 1  $\mu\text{mol}$  de fenazina metasulfato; 0,2  $\mu\text{moles}$  de  $\text{DPIP}_{\text{ox}}$  y una alícuota del extracto alcalino. La reacción se comienza por adición de 25  $\mu\text{l}$  (16,0 unidades) de alcohol deshidrogenasa.

Esta reacción se realiza primero en ausencia de extracto alcalino y con cantidades conocidas de NADH con objeto de hacer una recta de calibrado, relacionando concentración de NADH por un lado con velocidad de reducción

del  $\text{DPIP}_{\text{ox}}$  por otro ( $\Delta\text{D.O.}$  a 600 nm/min). Posteriormente se realiza con el extracto alcalino (solución problema) y a partir del  $\Delta\text{D.O.}$  a 600 nm se calcula, con ayuda de la recta de calibrado, la concentración de NADH.

El NADPH se mide exactamente igual que el NADH, excepto que la reacción se lleva a cabo en tampón Tris-ClH, pH 8,0 (200  $\mu\text{moles}$ ) y se omite en la mezcla de reacción el sistema etanol-alcohol deshidrogenasa, incluyendo en su lugar el sistema glucosa-6-fosfato (5  $\mu\text{moles}$ )-glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (14 unidades en 10  $\mu\text{l}$ ).



Los piridín-nucleótidos oxidados ( $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ ) se midieron según el mismo método utilizado para medir sus formas reducidas correspondientes, excepto que en estos casos se utilizó siempre el extracto ácido.

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente frente a un blanco con 0,15  $\mu\text{moles}$  de  $\text{DPIP}_{\text{ox}}$  en 2 ml de tampón. En ningún caso se observó interferencia alguna por

parte del correspondiente extracto utilizado.

#### II.4.4. *Medida del crecimiento celular*

Se obtuvo determinando la absorbancia a 660 nm de alícuotas tomadas de los cultivos, diluidas convenientemente cuando la densidad óptica era superior a 1,5.

#### II.4.5. *Determinación de nitrito*

El nitrito se determinó por la reacción de diazotación de Griess-Ilosway, según el método de Snell y Snell (76).

A la alícuota en la que se desea determinar la cantidad de nitrito se le añade 1 ml de reactivo de sulfanilamida y 1 ml de reactivo de N(-naftil)etilendiamina. La mezcla anterior se completa con agua hasta 5 ml y se deja desarrollar el color durante 10 min, a temperatura ambiente, antes de la lectura en el fotolorímetro. Se empleó una recta de calibrado construida con cantidades crecientes de nitrito tratadas en las mismas condiciones descritas.

#### II.4.6. *Determinación de proteína*

Para la determinación de la cantidad de proteína

se siguió el método de Lowry (49), utilizando seroalbúmina como proteína patrón.

#### II.4.7. *Determinaciones espectrofotométricas*

Los coeficientes de extinción molar empleados fueron: para NADH y NADPH (340 nm)  $6,2 \times 10^3$ , para el citocromo c reducido (550 nm)  $28 \times 10^3$  y para el NADP<sup>+</sup> (260 nm)  $18 \times 10^3$ .

Los productos coloreados que se forman cuando se valora el nitrito o la proteína se midieron a 540 y 500 nm respectivamente.

### II.5. REACTIVOS Y APARATOS

#### II.5.1. *Procedencia de los reactivos empleados*

Los piridín-nucleótidos, flavin-nucleótidos, adenín-nucleótidos, fosfoenolpiruvato, glucosa-6-fosfato, fenazina metasulfato y los enzimas alcohol deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, piruvato-quinasa, mioquinasa, hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, catalasa y superóxido dismutasa, así como el Tris y la DEAE-celulosa se adquirieron a SIGMA, St. Louis, USA.

El cianuro y ferricianuro potásicos, sulfato amónico, clorhidrato de metilamina, diclorofenol-indofenol y peróxido de hidrógeno se obtuvieron de MERCK, Darmsdat, Alemania; el Sephadex G-25 de PHARMACIA, Upsala, Suecia, y el sulfato de estreptomicina de la Cía. Española de Penicilina.

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

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

El CO<sub>2</sub> empleado en el cultivo de células fue suministrado por Coromina Industrial, Sevilla y el nitrógeno líquido por el Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de Sevilla.

### II.5.2. *Aparatos utilizados*

Para la recogida de células por filtración, y en el proceso de obtención de soluciones anaeróbicas se utilizó una bomba de vacío tipo BS 2406-G adquirida a GEC MACHINES LTD., U.K.

Las preincubaciones en anaerobiosis se realizaron en tubos de 2 ml de volumen aproximadamente, provistos de tapón de goma hermético, suministrados por la firma BECTON, DICKINSON and Co., Rutherford, New Jersey, USA.

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

Para las centrifugaciones se empleó una centrifuga SORVALL RC 2-B refrigerada o una ultracentrifuga Beckman Spinco, modelo L2-50B.

Las determinaciones espectrofotométricas se hicieron en un PYE-UNICAM SP 1800 con registro automático, las medidas colorimétricas en la zona visible en un Spectronic 700 de Bausch and Lomb.

Para la medida del pH se utilizó un aparato de escala expandida Methrom-Herisau, Modelo E-152.

Cuando fue necesario una agitación vigorosa de las preparaciones, se empleó un vibrador de alta velocidad Super-Mixer, suministrado por Lab-Line Instruments, USA.

El agua destilada se obtuvo con un destilador DRA. El aire empleado en el cultivo de las células en medio líquido, fue impulsado por una bomba de membrana de la firma Reciprotor, Dinamarca.



### III. RESULTADOS

### III.1. REGULACION DEL COMPLEJO ENZIMATICO NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca

#### III.1.1. *Inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella fusca*

La Tabla I muestra la inactivación in vivo de las actividades nitrato reductasas (i.e. NADH-nitrato reductasa y  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa) del complejo enzimático NADH-nitrato reductasa de Chlorella por adición a un cultivo de células, creciendo logarítmicamente en un medio con nitrato, de amonio -producto final del sistema reductor de nitrato de este alga- y también conocido desacoplante de la fosforilación acoplada al flujo no cíclico de electrones del aparato fotosintético, o bien por adición a dicho cultivo de arseniato o metilamina -desacoplantes de la fotofosforilación y compuestos no metabolizables por las células de Chlorella-. En todos los casos, la actividad de la mitad inicial del complejo (i.e., NADH-diaforasa) permanece prácticamente inalterada. Este singular efecto inactivante que radica en la segunda mitad del complejo enzimático NADH-nitrato reductasa, no tiene lugar en presencia de menadiona (vitamina  $\text{K}_3$ ) que actúa como aceptor del poder reductor fabricado durante el proceso fotosintético (41).

TABLA I

REGULACION in vivo DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca POR  
DISTINTOS TRATAMIENTOS

Tratamiento	Actividades específicas relativas		
	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa	FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa	NADH-diaforasa
Control	100	100	100
más amoniaco	18	20	92
más amoniaco + menadiona	145	120	97
más arseniato	25	14	71
más arseniato + menadiona	106	91	81
más metilamina	18	15	110
más metilamina + oscuridad	100	110	84
menos aire	41	52	85

Las condiciones experimentales utilizadas en cada caso estan especificadas en el trabajo: PROPIEDADES REGULADORAS DE LA NITRATO REDUCTASA DEL ALGA Chlorella. J.M. Maldonado, M.C. Pueyo y A. Chaparro. Rev. Real Acad. Cien. Madrid, 68, 633 (1974).

Por otra parte es interesante resaltar aquí la reversibilidad de este proceso, ya que la nitrato reductasa inactivada por cualquiera de los tratamientos indicados en la Tabla I podía reactivarse de forma prácticamente completa: in vivo, por simple eliminación del agente inactivante del medio de cultivo; e in vitro, tratando el enzima inactivo con pequeñas cantidades de ferricianuro, que reoxida la proteína.

La protección por menadiona contra la inactivación in vivo y la reactivación in vitro por la acción del ferricianuro sugieren la esencialidad del poder reductor para mantener inactiva la nitrato reductasa.

### III.1.2. Inactivación in vitro de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca*

La Tabla II muestra una recopilación de los distintos tratamientos que in vitro conducen a la inactivación de la actividad terminal del complejo NADH-nitrato reductasa (i.e. FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa) y consecuentemente de la actividad total del mencionado complejo (i.e. NADH-nitrato reductasa), permaneciendo prácticamente inalterada la actividad inicial (NADH-diaforasa).

TABLA II

INACTIVACION in vitro DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca POR  
DISTINTOS TRATAMIENTOS

Tratamiento	Actividades específicas relativas		
	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa	FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa	NADH-diaforasa
Enzima	100	100	100
Enz + NADH	60	66	104
Enz + NADH + ADP	16	20	94
Enz + NADH + CN <sup>-</sup>	7	10	90
Enz + NADPH	53	52	97
Enz + NADPH + ADP	51	47	98
Enz + NADPH + CN <sup>-</sup>	20	15	93

Esta tabla resume los distintos tratamientos que inactivan in vitro la nitrato reductasa de Chlorella fusca. Las condiciones experimentales utilizadas y los controles que obviamente faltan por incorporar en la Tabla (con objeto de que ésta sea lo más clara posi-ble) están descritos indistintamente en los siguientes trabajos:

- MECANISMO DE ACCION Y REGULACION DEL COMPLEJO ENZIMATICO NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella. J.M. Vega. Tesis Doctoral, Sevilla (1972).

- REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca. J.M. Maldonado. Tesis Doctoral, Sevilla (1974).

Todos los tratamientos indicados en la Tabla II requieren básicamente poder reductor, ya sea NADH, donador fisiológico de electrones del enzima, o NADPH, que no dá electrones al enzima de Chlorella fusca para la reducción de nitrato.

Es interesante destacar en esta Tabla que el cinuro, conocido agente quelante de metales, especialmente de hierro o molibdeno -componentes metálicos de la proteína- coopera eficazmente con el reductor, independientemente de su naturaleza, en la inactivación de la nitrato reductasa.

Sin embargo el ADP, forma descargada junto con el AMP de los adenín-nucleótidos, coopera específicamente con el NADH, y no con el NADPH, en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa.

En todos los casos aquí reseñados, la nitrato reductasa inactiva podía reactivarse completamente in vitro por adición de una pequeña cantidad de ferricianuro.

### III.1.3. *Cinética de la inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por incubación con NAD(P)H*

La figura 1 muestra los resultados obtenidos al preincubar la nitrato reductasa de Chlorella fusca con NADH (parte superior) o NADPH (parte inferior) a concentraciones crecientes.

Una concentración de 0,1 mM del piridín-nucleótido reducido en la mezcla de incubación es prácticamente saturante en su efecto inactivante del enzima, sin embargo cuando se utilizan concentraciones inferiores, los resultados de la figura 1 indican que el NADH es más efectivo que el NADPH en su efecto inactivante sobre la nitrato reductasa, ya que a una concentración final de 10  $\mu$ M, la inactivación alcanzada al final del experimento fue de un 70% cuando se utilizó NADH y de un 20% aproximadamente cuando se utilizó NADPH como agente inactivante.

### III.1.4. *Efecto del $NADP^+$ y nitrato en la inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación del enzima con piridín-nucleótidos reducidos*

La Tabla III muestra que el nitrato a baja con-

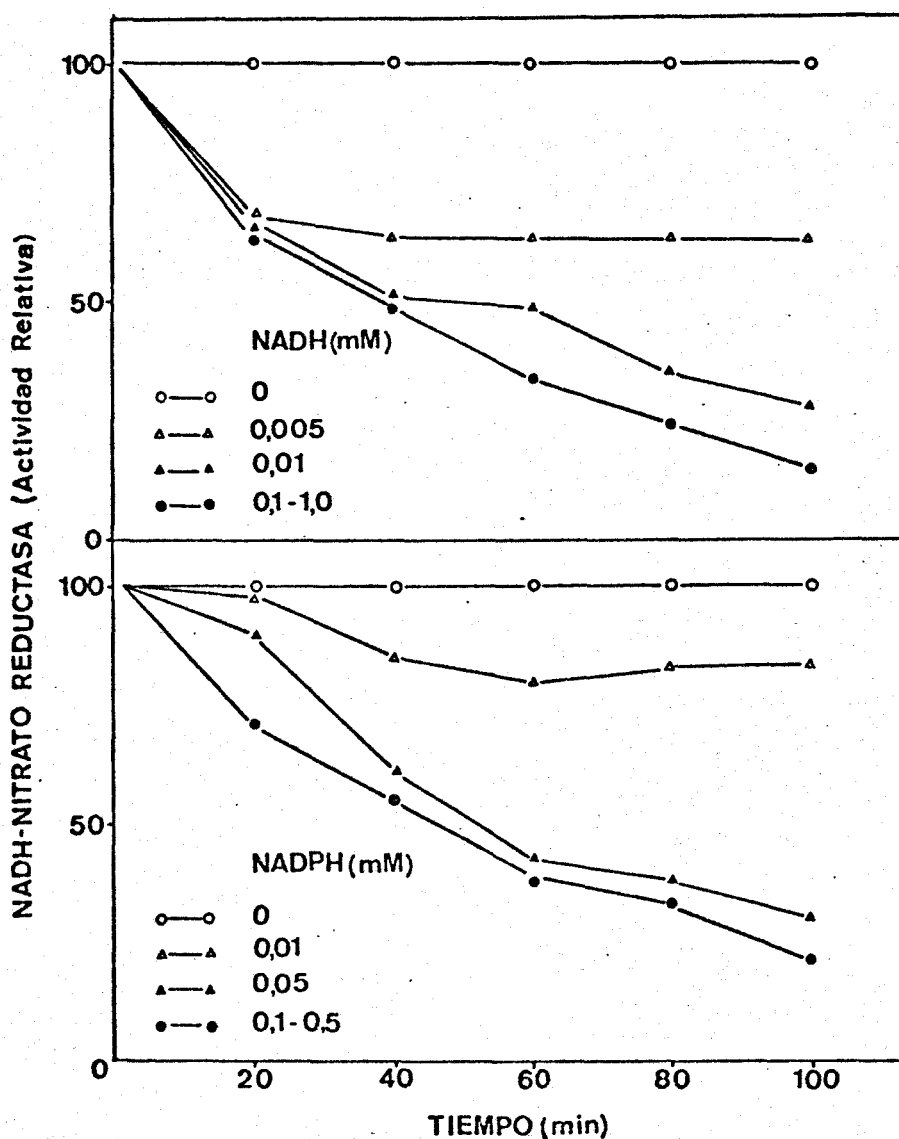


Fig. 1. Cinética de la inactivación de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* por preincubación con piridín-nucleótidos reducidos. Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 0,83 mg de proteína) se preincubó a 0°C, en un volumen final de 1 ml con 100  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5, y los piridín-nucleótidos a las concentraciones indicadas. La actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 4,9 nanomoles de nitrito formados por min.



TABLA III

EFFECTO DEL  $\text{NADP}^+$  Y BAJAS CONCENTRACIONES DE NITRATO SOBRE LA INACTIVACION in vitro DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca POR PIRIDIN-NUCLEOTIDOS REDUCIDOS

Mezcla de incubación	NADH-nitrato reductasa (%)
Enzima	100
Enz + NADH	14
Enz + NADH + $\text{NADP}^+$	8
Enz + NADH + $\text{NO}_3^-$	58
Enz + NADPH	11
Enz + NADPH + $\text{NADP}^+$	15
Enz + NADPH + $\text{NO}_3^-$	75

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 0,6 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 1 ml con 175  $\mu\text{moles}$  de tampón Tris-ClH, pH 7,5; y donde se indica 0,1  $\mu\text{moles}$  de NADH; 0,1  $\mu\text{moles}$  de NADPH; 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NADP}^+$  y 45 nanomoles de  $\text{NO}_3\text{K}$ . Después de 90 min de incubación a 0°C, la actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 8,25 nanomoles de NADH oxidados por min.

centración, protege eficazmente a la nitrato reductasa contra la inactivación por preincubación con piridín-nucleótido reducido. Las formas oxidadas de los piridín-nucleótidos, como se muestra en esta tabla para el caso del  $\text{NADP}^+$ , no ejercen efecto protector alguno, contrariamente a lo ya publicado para otras nitrato reductasas (27). Es interesante resaltar aquí, que cuando se utilizó  $\text{NADP}^+$  para este tipo de experimento dió positivo inicialmente el efecto protector, debido a que dicho producto, adquirido en forma sólida de la casa Sigma, contiene un 4,5% en peso aproximadamente de nitrato como impureza, la cual era responsable de esa protección, ya que una solución de  $\text{NADP}^+$  previamente purificada por cromatografía de cambio iónico en DEAE-celulosa se utilizó en los experimentos de la Tabla III, con resultados claramente negativos.

En la mezcla que contiene  $\text{NADH}$  y nitrato, se forma nitrito a lo largo de la preincubación, no ocurriendo así en la que se usa  $\text{NADPH}$  y nitrato.

### III.1.5. *Inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con $\text{NADH}$ y $\text{ADP}$*

En la Tabla II se ha mostrado que el  $\text{ADP}$  coopera específicamente con el  $\text{NADH}$  en la inactivación in vitro de

la nitrato reductasa de Chlorella fusca. Los experimentos que a continuación detallamos, van encaminados a una caracterización exhaustiva de las condiciones bajo las que esta cooperación es óptima.

En primer lugar, los resultados de las Tablas IV y V muestran que se requiere la presencia de iones inorgánicos ( $\text{ClNa}$  o  $\text{Cl}_2\text{Mg}$ ) en la mezcla de incubación para alcanzar una efectiva inactivación del enzima por NADH y ADP. En las condiciones experimentales empleadas, el incremento de la fuerza iónica del medio, provocado por la adición de cualquiera de las sales, posibilita la interacción del ADP con la proteína cuando se encuentra presente el NADH. Por otra parte, como se aprecia en la Tabla IV, el cloruro magnésico no posee ningún efecto adicional sobre la actividad del enzima en ausencia o presencia del piridín-nucleótido reducido, y aunque no se recoge en esta tabla, la adición de ADP y cloruro magnésico al enzima no provoca efecto inactivante alguno sobre su actividad si no está presente el piridín-nucleótido reducido. Similares resultados se obtienen al reemplazar el cloruro magnésico por cloruro sódico a la misma concentración (10 mM). Dicha concentración se encuentra dentro del rango fisiológico para los iones

TABLA IV

EFFECTO DEL CLORURO MAGNESICO EN LA INACTIVACION DE LA  
 NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca POR  
 PREINCUBACION CON NADH Y ADP

Mezcla de incubación	NADH-nitrato reductasa (%)
Enzima	100
Enz + Cl <sub>2</sub> Mg	100
Enz + NADH	43
Enz + NADH + Cl <sub>2</sub> Mg	40
Enz + NADH + ADP	47
Enz + NADH + ADP + Cl <sub>2</sub> Mg	24

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 0,5 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 1 ml con 200  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; y donde se indica 10  $\mu$ moles de Cl<sub>2</sub>Mg; 0,1  $\mu$ mol de NADH y 0,1  $\mu$ mol de ADP. Al cabo de 40 min a 0°C, la actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 6,3 nanomoles de nitrito formados por min.

TABLA V

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO SODICO SOBRE LA  
 INACTIVACION in vitro DE LA NITRATO REDUCTASA DE  
Chlorella fusca POR NADH Y ADP

Mezcla de incubación	NADH-nitrato reductasa (%)
Enzima	100
Enz + NADH	56
Enz + NADH + ADP	56
Enz + NADH + ADP + ClNa	12

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 0,53 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 0,5 ml con 50  $\mu$ moles de Tris-ClH, pH 7,5; y donde se indica 0,15  $\mu$ moles de NADH; 0,15  $\mu$ moles de ADP y 5  $\mu$ moles de ClNa. Al cabo de 60 min a 0°C, la actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 7,9 nanomoles de NADH oxidados por min.

$\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (84). Cuando la concentración de ambas sales en la mezcla de incubación fue diez veces inferior, 1 mM, no tuvo lugar una cooperación efectiva entre el NADH y el ADP, en la inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca (resultados no mostrados).

También se ha estudiado la influencia del pH, en una zona comprendida entre 6,5-8,5, en la inactivación de la mitad terminal del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH y ADP. La Tabla VI muestra que la inactivación del enzima ocurre especialmente a pH alto. En la zona de pH utilizada para estos experimentos, no se observó efecto alguno sobre la actividad nitrato reductasa, a no ser que se añadieran el NADH y ADP. La Tabla VI también nos revela que la naturaleza del tampón utilizado es otro factor a tener en cuenta ya que la inactivación de la nitrato reductasa por NADH y ADP no tenía lugar en tampón de fosfato potásico, pH 7,5, siendo del 40% si el tampón utilizado era Tris-ClH, pH 7,5.

TABLA VI

EFFECTO DEL pH SOBRE LA INACTIVACION in vitro DE LA NITRATO  
 REDUCTASA DE Chlorella fusca POR NADH Y ADP

Tampón	pH	NADH-nitrato reductasa (%)
Fosfato potásico	6,5	100
" "	7,0	100
" "	7,5	100
Tris-ClH	7,5	60
" "	8,0	43,5
" "	8,5	20

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 2,4 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 1 ml con 10  $\mu$ moles de  $Cl_2Mg$ ; 0,1  $\mu$ mol de NADH; 0,1  $\mu$ mol de ADP y 100  $\mu$ moles de tampón. Después de dos horas y media de incubación a 0°C, la actividad enzimática se determinó por adición de 0,1 ml de la correspondiente mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. Las actividades enzimáticas están expresadas como tantos por ciento del control sin los nucleótidos al correspondiente pH. 100% de actividad: 6,4 nanomoles de NADH oxidados por min.

III.1.6. *Efecto de la concentración de ADP sobre la inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH y ADP en presencia de cloruro magnésico*

Los resultados recogidos en la Figura 2 muestran que la cooperación entre NADH y ADP para inactivar la nitrato reductasa de Chlorella fusca es máxima, cuando la concentración de ADP utilizada fue equimolecular con la de NADH (0,3 mM). A concentraciones más alta (1 y 3 mM) el ADP no afectó a la actividad enzimática.

Por último se estudió la cinética de inactivación del enzima por preincubación con NADH y ADP, a concentración variable pero siempre equimoleculares. Los resultados presentados en la Figura 3, muestran que cuando ambos nucleótidos se encontraban a una concentración final 0,1 mM cada uno, la inactivación del enzima era prácticamente total a los 20 min de incubación. El efecto cooperativo entre NADH y ADP, a concentración 10  $\mu$ M cada nucleótido, también aparece claramente en la Figura 3, aunque el tiempo requerido para inactivar la nitrato reductasa es lógicamente algo mayor.



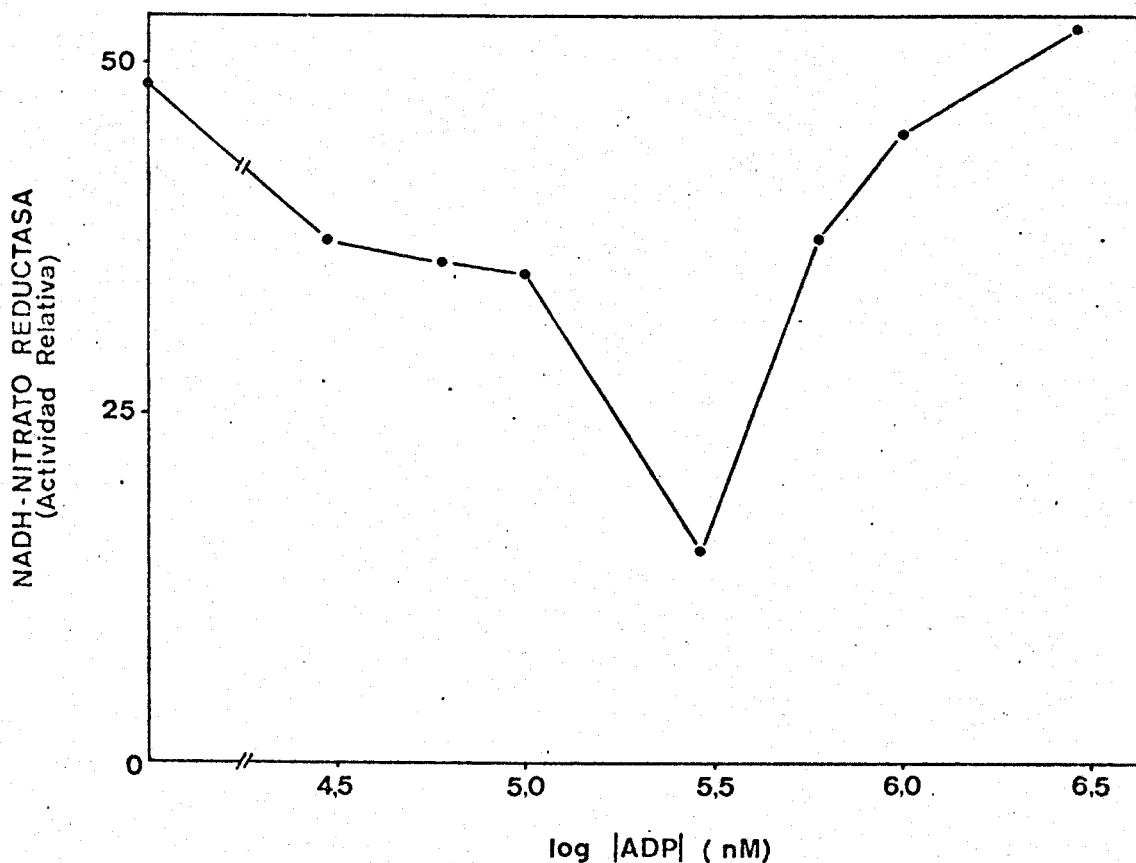


Fig. 2. Efecto de la concentración de ADP sobre la inactivación *in vitro* de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* por *NADH* y *ADP*. Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 1,56 mg de proteína) se preincubó a 0°C, durante 150 min, en un volumen final de 1,5 ml con 150  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 8,0; 15  $\mu$ moles de  $Cl_2Mg$ ; 0,45  $\mu$ moles de *NADH*; y *ADP* a las concentraciones indicadas. La actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo y están expresadas como tantos por ciento del control sin los nucleótidos. 100% de actividad: 12,7 nanomoles de *NADH* oxidados por min.

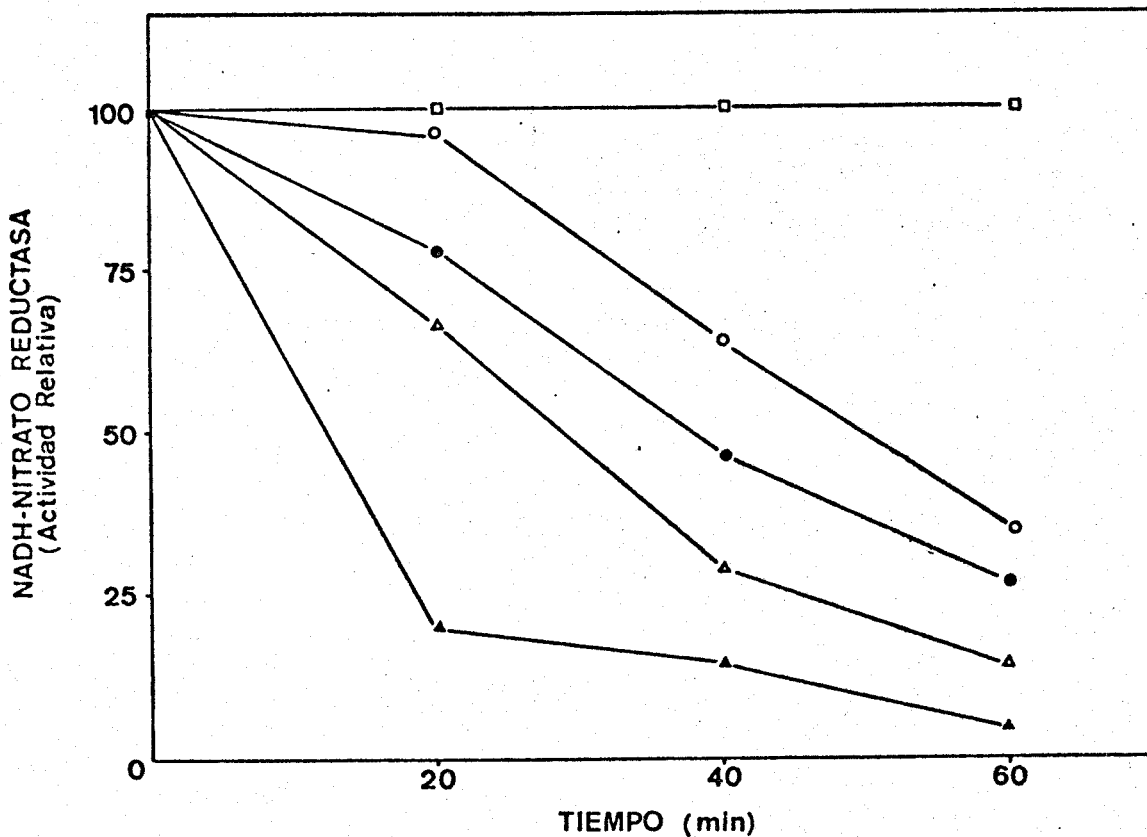


Fig. 3. *Cinética de inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por incubación con NADH y ADP.* Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 0,5 mg de proteína) se preincubó a 0°C, en un volumen final de 1 ml con 200 μmoles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; 10 μmoles de Cl<sub>2</sub>Mg y con las cantidades de nucleótidos que a continuación se indican: ninguno (□); 0,01 μmol de NADH (○); 0,1 μmol de NADH (Δ); 0,01 μmol de NADH más 0,01 μmol de ADP (●); 0,1 μmol de NADH más 0,1 μmol de ADP (▲). La actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 6,4 nanomoles de nitrito formados por min.

La inactivación de la nitrato reductasa aquí presentada radica en la parte terminal del enzima, ya que la actividad NADH-diaforasa del complejo enzimático no se afectaba significativamente, en ningún caso, bajo las condiciones experimentales utilizadas. Por otra parte, el carácter reversible de dichas inactivaciones se puso de manifiesto porque cada preparación enzimática recuperaba su actividad inicial al tratarla con ferricianuro.

III.2. CORRELACION ENTRE LA REGULACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca Y LOS NIVELES INTRACELULARES DE PIRIDIN-NUCLEOTIDOS REDUCIDOS Y ADENIN-NUCLEOTIDOS DESCARGADOS

III.2.1. *Medida de los niveles intracelulares de piridín-nucleótidos y adenín-nucleótidos*

Los piridín-nucleótidos oxidados ( $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ ) y los adenín-nucleótidos (AMP, ADP y ATP) se midieron luego de una extracción ácida de las células según se ha indicado en el apartado Materiales y Métodos.

Los piridín-nucleótidos reducidos (NADH y NADPH) se midieron luego de una extracción alcalina de las células bajo las condiciones indicadas en el apartado Materiales y Métodos.

III.2.1.1. Efecto del método usado en la preparación de extractos sobre el contenido en piridín-nucleótidos

Para comprobar si los niveles de piridín-nucleótidos intracelulares podrían afectarse por el tratamiento previo, ácido o alcalino, al que se someten las células antes de proceder a su determinación cuantitativa, se hizo el experimento cuyos resultados se presentan en la Tabla VII.

TABLA VII

RECUPERACION DE PIRIDIN-NUCLEOTIDOS DESPUES DE LOS TRATAMIENTOS  
USADOS PARA SU EXTRACCION

	Tratamiento ácido		Tratamiento alcalino	
	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>	NADH	NADPH
nanomoles puestos	25	25	25	25
$\Delta DO_{600 \text{ nm}}/\text{min}$	0,13	0,48	0,17	0,62
nanomoles recuperados	24,50	23,50	25,08	24,20
% recuperación	98,02	94,00	100,30	96,80

Se preparó 1 ml de tampón Tris-ClH, 50 mM, pH 7,5, con teniendo las cantidades indicadas de los cuatro piridín-nucleótidos. 0.5 ml de esta mezcla se trataron separadamente con ácido por un lado y base por otro, según se indica en Materiales y Métodos. Posteriormente se determinó la concentración de NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> en la preparación que se trató con ácido y la de NADH y NADPH en aquella que se trató con base. Para más detalles acerca de los métodos analíticos utilizados ver Materiales y Métodos.

Se preparó una mezcla con cantidades equimoleculares de piridín-nucleótidos ( $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADPH}$ ) y a partir de ella se hicieron dos alícuotas iguales, una se sometió al tratamiento ácido y otra al tratamiento alcalino (ver Materiales y Métodos), y posteriormente se analizaron los piridín-nucleótidos correspondientes en cada una de las alícuotas preparadas. Los resultados de la Tabla VII indican que la recuperación es buena y los tratamientos ácidos y alcalinos de las células perfectamente fiables. Un experimento similar se realizó utilizando sólo adenín-nucleótidos y se comprobó que la recuperación era también aceptable, después del tratamiento ácido correspondiente.

III.2.2. *Inactivación de la nitrato reductasa y efecto en el nivel intracelular de piridín- y adenín-nucleótidos por adición de metilamina a células de Chlorella fusca*

Células de Chlorella fusca se recogieron, a partir de un cultivo con nitrato como fuente de nitrógeno y en fase exponencial de crecimiento, por centrifugación a baja velocidad, y se lavaron con tampón Tris-ClH, 50 mM, pH 7,5. Seguidamente, 2,5 g de células (peso fresco) se resuspendieron por cada 90 ml de medio de cultivo

fresco que contenía nitrato (16 mM), como fuente de nitrógeno y esta suspensión concentrada de células se utilizó para los experimentos que se describen a continuación.

La Tabla VIII muestra que al tratar durante 2 h una suspensión concentrada de células de Chlorella fusca con metilamina, la nitrato reductasa se inactiva casi completamente. Aunque no se indica en la tabla, la actividad inicial de complejo NADH-nitrato reductasa (i.e. NADH-diaforasa) permaneció alta durante el tratamiento. Paralelamente a la inactivación de la nitrato reductasa se observa (Tabla VIII) un incremento en el nivel intracelular de las formas reducidas de los piridín-nucleótidos (NADH y NADPH) y una simultánea disminución de los niveles de sus correspondientes formas oxidadas ( $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ ).

Por otra parte, la Tabla IX muestra que la inactivación in vivo de la nitrato reductasa por acción de la metilamina, va también acompañada de un incremento de las formas descargadas de los nucleótidos de adenina (ADP y AMP) y una disminución en el nivel de ATP. En consecuencia, estos resultados suponen una disminución global de la carga energética del sistema del ATP  $\left(\frac{\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}\right)$  en

TABLA VIII

EFFECTO DE LA METILAMINA SOBRE LOS NIVELES DE PIRIDIN-  
NUCLEOTIDOS Y DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN EL  
ALGA VERDE Chlorella fusca

	Control	+ Metilamina
NAD <sup>+</sup>	0,98	0,45
NADH	0,28	0,40
NADP <sup>+</sup>	0,22	0,18
NADPH	0,16	0,19
$\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}^+}$	0,29	0,88
$\frac{\text{NADPH}}{\text{NADP}^+}$	0,76	1,04
$\frac{\text{NADH} + \text{NADPH}}{\text{NAD}^+ + \text{NADP}^+}$	0,37	0,92
FNH <sub>2</sub> -nitrato reductasa (%)	100	8,5

Metilamina (60 mM) se añadió a una suspensión concentrada de células de Chlorella fusca, en NO<sub>3</sub>K 16 mM. Al cabo de 2 h en la luz y con una corriente continua de CO<sub>2</sub> al 5% (v/v) en aire, la actividad enzimática FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se determinó en los correspondientes extractos crudos, y se expresa como tanto por ciento de la del control sin tratar con el desacoplante. Las cantidades de piridín-nucleótidos, expresadas en  $\mu\text{moles/g}$  de peso seco de células, se determinaron según se indica en Materiales y Métodos.



TABLA IX

EFEECTO DE LA METILAMINA SOBRE LOS NIVELES DE ADENIN-NUCLEOTIDOS  
Y DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN EL ALGA VERDE

Chlorella fusca

	Control	+ Metilamina
ATP	2,24	1,53
ADP	1,68	2,29
AMP	0,67	0,84
$\frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP + ADP + AMP}$	0,67	0,57
Piruvato	0,59	1,07
Glucosa-6-fosfato	1,10	1,83
FNH <sub>2</sub> -nitrato reductasa (%)	100	21

Metilamina (60 mM) se añadió a una suspensión concentrada de células de Chlorella fusca, en NO<sub>3</sub>K 16 mM. Al cabo de 2 h en la luz y con una corriente continua<sup>3</sup> de CO<sub>2</sub> al 5% (v/v) en aire, la actividad enzimática FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se determinó en los correspondientes extractos crudos, y se expresa como tanto por ciento de la del control sin tratar con el desacoplante. Las cantidades de adenín-nucleótidos, piruvato y glucosa-6-fosfato, expresadas en  $\mu$ moles/g de peso seco de células, se determinaron según se indica en Materiales y Métodos.

Chlorella fusca. Asimismo la Tabla IX también nos indica, que como consecuencia de la adición de metilamina al medio de cultivo, ocurre un incremento de los niveles intracelulares de glucosa-6-fosfato, sustrato de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y de piruvato, producto del enzima piruvatoquinasa.

Los resultados mostrados en las Tablas VIII y IX son representativos de, por lo menos, 5 experimentos de este tipo.

III.2.3. *Inactivación de la nitrato reductasa y efecto en el nivel intracelular de piridín- y adenín-nucleótidos por adición de amoniaco a células de Chlorella fusca*

La Tabla X muestra que al tratar durante 2 h una suspensión concentrada de células de Chlorella fusca (preparada según se indica en el apartado anterior) con amoniaco, la nitrato reductasa se inactiva notablemente en su actividad terminal, i.e. FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa, a la vez que se observa un incremento en el nivel intracelular de las formas reducidas de los piridín-nucleótidos (NADH y NADPH) mientras que decrecen equivalentemente los niveles de sus correspondientes formas oxidadas (NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>).

TABLA X

EFFECTO DEL AMONIACO SOBRE LOS NIVELES DE PIRIDIN-NUCLEOTIDOS  
Y DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN EL ALGA VERDE

Chlorella fusca

	Control	+ Amoniaco
NAD <sup>+</sup>	0,24	0,13
NADH	0,07	0,12
NADP <sup>+</sup>	0,39	0,26
NADPH	0,19	0,32
$\frac{\text{NADH}}{\text{NAD}^+}$	0,28	0,94
$\frac{\text{NADPH}}{\text{NADP}^+}$	0,49	1,21
$\frac{\text{NADH} + \text{NADPH}}{\text{NAD}^+ + \text{NADP}^+}$	0,41	1,12
FNH <sub>2</sub> -nitrato reductasa (%)	100	61

Las condiciones experimentales utilizadas fueron similares a las indicadas en la Tabla VIII, excepto que sulfato amónico (90 mM) se utilizó como agente inactivante del enzima, en vez de metilamina.

La Tabla XI muestra por otra parte que la inactivación in vivo de la nitrato reductasa, que solamente alcanza un 25% en las condiciones experimentales indicadas, va acompañada de un ligero incremento en el nivel intracelular de ADP y una notable disminución en el nivel de ATP. Como se indica en la misma tabla, el nivel intracelular de glucosa-6-fosfato aumenta sensiblemente, permaneciendo prácticamente constante el nivel de piruvato. Es interesante, sin embargo, resaltar en esta tabla que cuando las variaciones en los niveles intracelulares de los metabolitos reseñados no son muy grandes, tampoco se consiguió una drástica inactivación del enzima.

TABLA XI

EFEECTO DEL AMONIACO SOBRE LOS NIVELES DE ADENIN-NUCLEOTIDOS  
Y DE ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN EL ALGA VERDE

Chlorella fusca

	Control	+ Amoniaco
ATP	1,61	0,73
ADP	1,48	1,76
AMP	0,95	0,87
$\frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP + ADP + AMP}$	0,58	0,48
Piruvato	0,55	0,63
Glucosa-6-fosfato	1,39	2,43
$FNH_2$ -nitrato reductasa (%)	100	75

Sulfato amónico (80 mM) se añadió a una suspensión concentrada de células de Chlorella fusca, en  $NO_3K$  30 mM. Al cabo de 3 h en la luz y con una corriente continua de  $CO_2$  al 5% (v/v) en aire, se procedió a medir la actividad  $FNH_2$ -nitrato reductasa y el nivel intracelular de los meta**bolitos** indicados según se especifica en la Tabla IX.

### III.3. PAPEL DEL OXIGENO EN LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca

#### III.3.1. *Observaciones in vitro*

##### III.3.1.1. Requerimiento de oxígeno para la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella fusca

La Figura 4 muestra que el oxígeno es requerimiento sine qua non para conseguir una completa inactivación in vitro de la actividad NADH-nitrato reductasa por preincubación a 0°C de una preparación parcialmente purificada del enzima con piridín-nucleótido reducido, ya que si la preincubación se realiza bajo una atmósfera inerte de argón, la actividad enzimática permanece alta, mientras que si se lleva a cabo en una atmósfera aeróbica, la inactivación de la nitrato reductasa es superior al 95% al final del experimento.

Similares resultados se obtienen cuando se obtienen cuando se utiliza NADH más cianuro como sistema inactivante de la nitrato reductasa de Chlorella fusca (Figura 5).

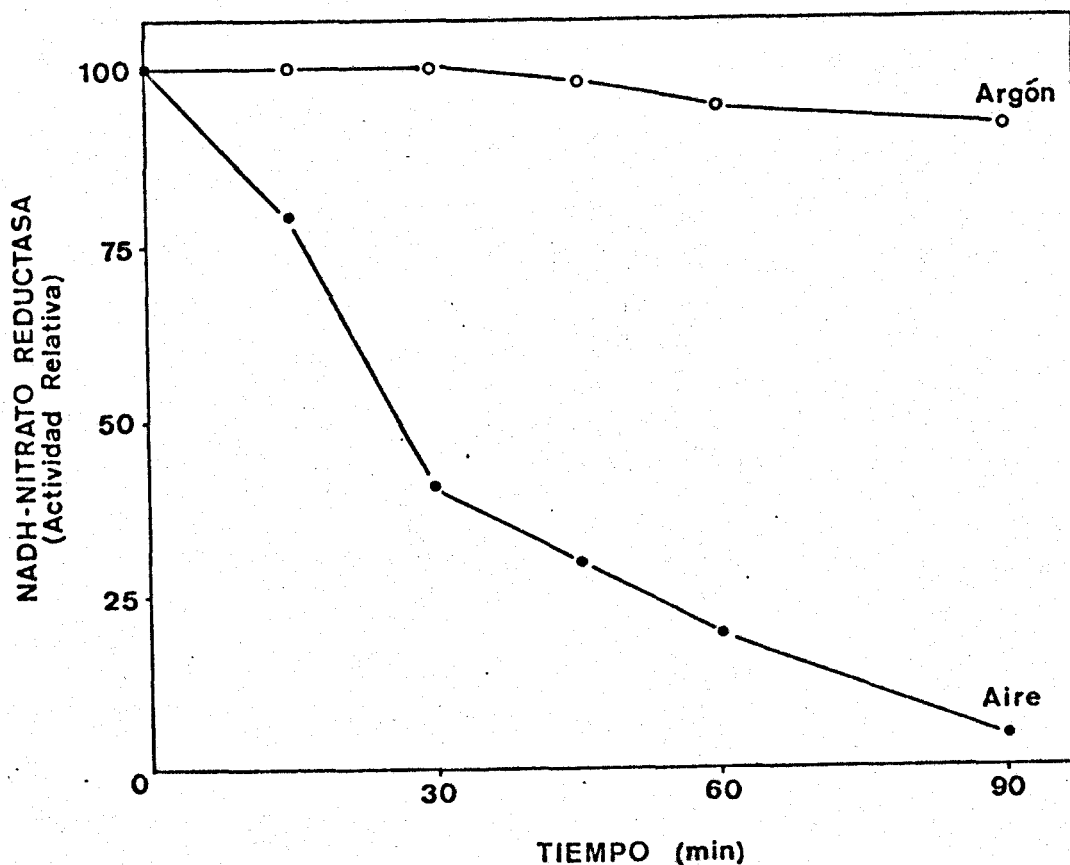


Fig. 4. *Requerimiento de oxígeno para la inactivación in vitro por NADH de la nitrato reductasa de Chlorella fusca. Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación II, ver Métodos, 1 mg de proteína) en 0,9 ml de tampón Tris-ClH, 0,1 M, pH 7,5, se puso en un tubo de ensayo pequeño con tapón de goma y se hizo anaeróbica (ver Métodos). Posteriormente se le añadió 0,1 ml de una solución anaeróbica de NADH 6 mM en el mismo tampón, con ayuda de una microjeringa Hamilton. Paralelamente se preparó otra mezcla de incubación semejante, pero omitiendo la anaerobiosis. Ambas soluciones se preincubaron a 0°C y la actividad NADH-nitrato reductasa se analizó, a los tiempos indicados, por adición de 0,1 ml de la correspondiente mezcla de incubación a los reactivos del ensayo standard. 100% de actividad: 15 nanomoles de NADH oxidados por min.*

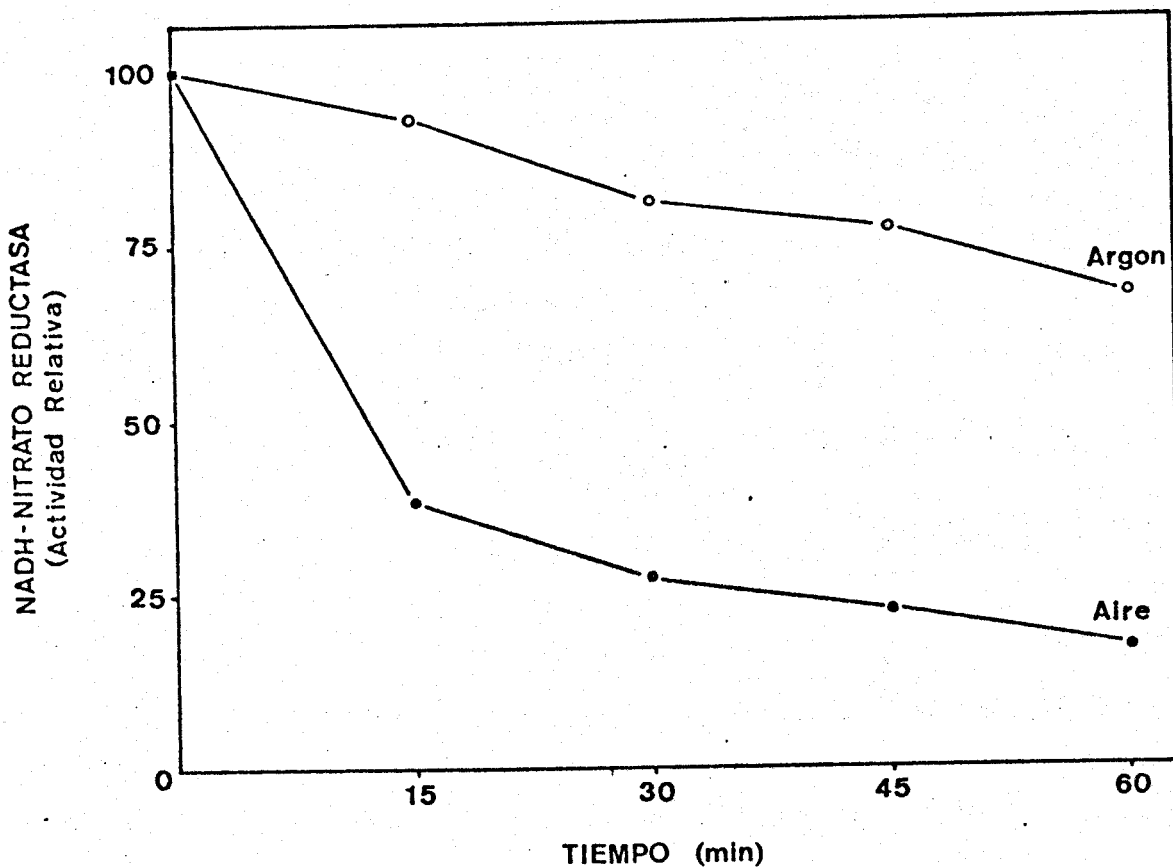


Fig. 5. *Requerimiento de oxígeno para la inactivación de la NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH y cianuro.* Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación II, ver Métodos, 0,9 mg de proteína) en 0,9 ml de tampón Tris-ClH, 0,1 M, pH 7,5, conteniendo CNK, 5  $\mu$ M, se puso en un tubo de ensayo pequeño con tapón de goma y se hizo anaeróbica (ver Métodos). Posteriormente se le añadió 0,1 ml de una solución anaeróbica de NADH 6 mM en el mismo tampón, con ayuda de una microjeringa Hamilton. Paralelamente, se preparó otra mezcla de incubación semejante, pero omitiendo la anaerobiosis. Ambas soluciones se preincubaron a 0°C y la actividad NADH-nitrato reductasa se analizó, a los tiempos indicados, por adición de 0,1 ml de la correspondiente mezcla de incubación a los reactivos del ensayo standard. 100% de actividad: 13,9 nanomoles de NADH oxidados por min.



III.3.1.2. Protección por catalasa o superóxido dismutasa contra la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella dependiente de NADH

Los resultados mostrados en la Tabla XII indican que cuando catalasa o superóxido dismutasa se incluyen, separadamente o juntas, en la mezcla de preincubación aeróbica del enzima con NADH, la nitrato reductasa se protege efectivamente contra la inactivación in vitro, indicando la participación de superóxido y/o peróxido en el mecanismo de inactivación del enzima.

La Figura 6 muestra estudios cinéticos de protección contra la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella por NADH, utilizando cantidades limitantes de catalasa y superóxido dismutasa con objeto de clarificar si la acción de estas enzimas podría ser aditiva. Los resultados de esta figura indican que la superóxido dismutasa es algo más efectiva que la catalasa, pero no existe una diferencia significativa cuando se protege con superóxido dismutasa sola o en presencia de catalasa.

TABLA XII

PROTECCION POR CATALASA Y SUPEROXIDO DISMUTASA CONTRA LA  
 INACTIVACION in vitro POR NADH DE LA NITRATO REDUCTASA  
 DE Chlorella fusca

Mezcla de incubación	NADH-nitrato reductasa (%)
Enzima	100
Enz + NADH	20
Enz + NADH + catalasa	91
Enz + NADH + superóxido dismutasa	89
Enz + NADH + catalasa + superóxido dismutasa	87

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación II, ver Métodos, 0,58 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 0,5 ml con 50  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; y donde se indica 0,3  $\mu$ moles de NADH; 15.000 unidades de catalasa (1,15 mg de proteína) y 15.000 unidades de superóxido dismutasa (5,2 mg de proteína). Al cabo de 90 min de incubación a 0°C, la actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de la correspondiente mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 13,9 nanomoles de NADH<sup>-</sup> oxidados por min.

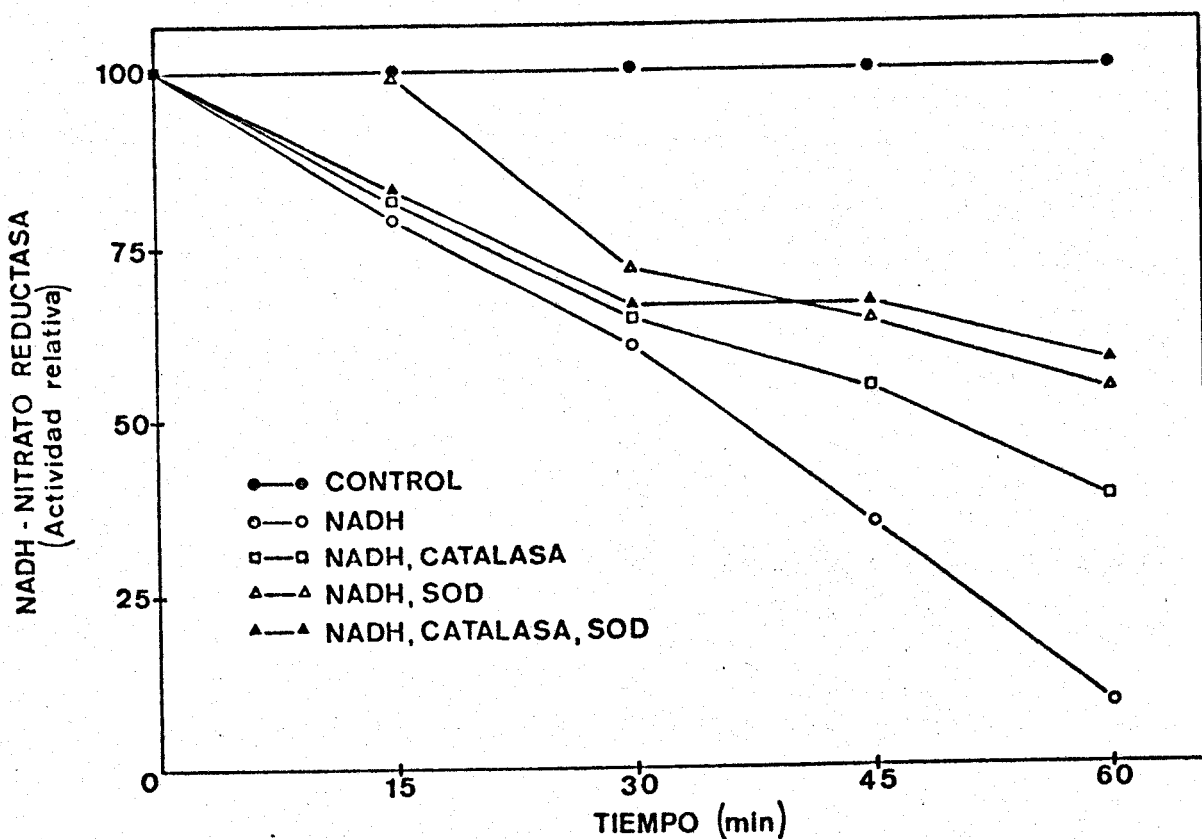


Fig. 6. Efecto de concentraciones limitantes de catalasa y superóxido dismutasa sobre la cinética de inactivación de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* por preincubación con NADH. Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación II, ver Métodos, 0,42 mg de proteína) se preincubó a 0°C con 50  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; y según se indica 0,15  $\mu$ moles de NADH; 7.500 unidades de catalasa y 3.000 unidades de superóxido dismutasa. La actividad enzimática se midió a los tiempos indicados por adición de 0,05 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 6,5 nanomoles de NADH oxidados por min.

III.3.1.3. Protección por catalasa o superóxido dismutasa contra la inactivación in vitro por NADH y cianuro de la nitrato reductasa de Chlorella

La Tabla XIII muestra que cuando catalasa o su superóxido dismutasa se incluyen, separadamente o juntas, en una mezcla aeróbica de preincubación de nitrato reductasa parcialmente purificada de Chlorella con NADH y cianuro, la actividad NADH-nitrato reductasa se protege muy eficazmente contra la inactivación inducida por la presencia de NADH y cianuro. Los datos de esta tabla muestran claramente que la superóxido dismutasa es más eficaz en su efecto protector que la catalasa. La cantidad de cianuro (1,25 nanomoles) utilizada en este experimento es evidentemente insuficiente para una posible inhibición de la catalasa añadida (2,6  $\mu$ moles) o de la superóxido dismutasa (74 nanomoles). Por otra parte al ser la catalasa una hemoproteína y la superóxido dismutasa una proteína que contiene  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  podrían proteger la actividad nitrato reductasa "retirando" el cianuro puesto en la mezcla de incubación; sin embargo dada la gran afinidad que presenta la nitrato reductasa reducida con NADH por el cianuro, incluso a muy bajas concentraciones (37), nos inclina

TABLA XIII

PROTECCION POR CATALASA Y SUPEROXIDO DISMUTASA CONTRA LA  
 INACTIVACION in vitro POR NADH Y CIANURO DE LA NITRATO  
 REDUCTASA DE Chlorella fusca

Mezcla de incubación	NADH-nitrato reductasa (%)
Enzima	100
Enz + NADH	69
Enz + NADH + $CN^-$	11
Enz + NADH + $CN^-$ + catalasa	50
Enz + NADH + $CN^-$ + superóxido dismutasa	100
Enz + NADH + $CN^-$ + catalasa + superóxido dismutasa	82

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación II, ver Métodos, 0,45 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 0,5 ml con 50  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; y donde se indica 0,15  $\mu$ moles de NADH, 1,25 nanomoles de CNK; 7.500 unidades catalasa (0,575 mg de proteína) y 7.500 unidades de superóxido dismutasa (2,6 mg de proteína). Al cabo de 15 min de incubación a 0°C, la actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de la correspondiente mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 12,6 nanomoles de NADH oxidados por min.

mos a pensar que, bajo las condiciones experimentales empleadas, la afinidad de los enzimas protectores por el cianuro (a tan baja concentración) debe ser sensiblemente menor que la de la nitrato reductasa.

III.3.1.4. Protección por catalasa y superóxido dismutasa contra la inactivación in vitro por NADH y ADP de la nitrato reductasa de Chlorella

La inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella, por preincubación con NADH y ADP presenta análogos comportamiento a los ya vistos para otros agentes inactivantes (Tablas XII y XIII) con respecto a su protección por la presencia de catalasa o superóxido dismutasa. Los resultados presentados en la Tabla XIV muestran que la presencia de catalasa o superóxido dismutasa en la mezcla de incubación protegen eficazmente a la nitrato reductasa contra su inactivación in vitro por preincubación con cantidades equimoleculares de NADH y ADP.

III.3.1.5. Efecto del FAD en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella por preincubación con NADH y ADP

Los resultados presentados en la Tabla XV indi

TABLA XIV

PROTECCION POR CATALASA Y SUPEROXIDO DISMUTASA CONTRA LA  
 INACTIVACION in vitro POR NADH Y ADP DE LA NITRATO  
 REDUCTASA DE Chlorella fusca

Mezcla de incubación	NADH-nitrato reductasa (%)
Enzima	100
Enz + NADH + ADP	16
Enz + NADH + ADP + catalasa	70
Enz + NADH + ADP + superóxido dismutasa	90

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 0,49 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 1,5 ml con 100  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; 15  $\mu$ moles de Cl<sub>2</sub>Mg y donde se indica 0,45  $\mu$ moles de NADH; 0,45  $\mu$ moles de ADP; 10.000 unidades de catalasa y 10.000 unidades de superóxido dismutasa. Al cabo de 3 h de incubación a 0°C, la actividad enzimática se determinó por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 12,4 nanomoles de NADH oxidados por min.

TABLA XV

POTENCIACION POR FAD DE LA INACTIVACION in vitro POR NADH  
Y ADP DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca

Mezcla de incubación	NADH-nitrato reductasa (%)
Enzima	100
Enz + FAD	99
Enz + NADH + ADP	50
Enz + NADH + ADP + FAD	25

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 0,52 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 1 ml con 100  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; 10  $\mu$ moles de  $Cl_2Mg$  y donde se indica 0,3  $\mu$ moles de NADH; 0,3  $\mu$ moles de ADP y 0,1  $\mu$ mol de FAD. Después de 60 min a 0°C, la actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 9,5 nanomoles de NADH oxidados por min.



can, que bajo condiciones experimentales adecuadas, el FAD potencia sensiblemente la inactivación in vitro de la NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca por la acción conjunta de NADH y ADP.

III.3.1.6. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la inactivación in vitro de la NADH-nitrato reductasa de Chlorella

La nitrato reductasa de Chlorella se inactiva considerablemente por preincubación, durante 45 min a 0°C, de la proteína con NADH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los resultados de la Tabla XVI muestran que el peróxido de hidrógeno, a concentración 1 mM, no tiene ningún efecto sobre la actividad del enzima cuando éste está oxidado; sin embargo, contribuye eficazmente a su inactivación en presencia de NADH. Estos resultados reflejan el hecho de que el enzima es susceptible a la acción del peróxido sólo cuando se encuentra en estado reducido, pues aunque no se muestra en la tabla, el peróxido de hidrógeno, incluso a concentración 10 mM en la mezcla de incubación, no afecta significativamente al enzima oxidado.

TABLA XVI

EFFECTO DEL PEROXIDO DE HIDROGENO EN LA PREINCUBACION DE LA  
NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca CON NADH

Mezcla de incubación	NADH-nitrato reductasa (%)
Enzima	100
Enz + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100
Enz + NADH	48
Enz + NADH + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	22

Nitrato reductasa parcialmente purificada (preparación I, ver Métodos, 1,52 mg de proteína) se preincubó en un volumen final de 1 ml con 100  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; y donde se indica 0,3  $\mu$ moles de NADH y/o 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Después de 45 min a 0°C, la actividad enzimática se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo. 100% de actividad: 5,2 nanomoles de NADH oxidados por min.

### III.3.2. *Observaciones a nivel fisiológico*

Los experimentos que siguen tienen por objeto estudiar si el papel del oxígeno, observado anteriormente en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella, es de significancia fisiológica y no un mero artefacto químico que presenta el enzima bajo las condiciones utilizadas.

El problema nos lo planteamos de una forma indirecta, ya que obtener un cultivo de células de Chlorella estrictamente anaeróbico es prácticamente imposible, sobre todo si además resulta que el oxígeno es un subproducto del proceso básico de la fotosíntesis, la fotólisis de la molécula de agua. Por otra parte observaciones previas nos fueron indicando que podría existir una relación entre el nivel de catalasa de las células de Chlorella y la posibilidad de conseguir inactivar, in vivo, la nitrato reductasa.

#### III.3.2.1. Inactivación in vivo de la nitrato reductasa por adición de metilamina a cultivos de Chlorella fusca que presentan distintos niveles intracelulares de catalasa

Los resultados recogidos en la Tabla XVII indican

TABLA XVII

RELACION ENTRE EL NIVEL DE CATALASA DE UN CULTIVO DE Chlorella fusca Y LA INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO REDUCTASA POR TRATAMIENTO CON METILAMINA

Tratamiento	NADH-nitrato reductasa (mU/mg de proteína)	Catalasa ( $\Delta DO_{240 \text{ nm}}$ /min/mg prot)
Cultivo I	79	0,67
+ metilamina	78	0,48
Cultivo II	28	0,11
+ metilamina	4	0,19

Metilamina, 30 mM, se añadió a sendos cultivos de células de Chlorella, creciendo logarítmicamente a la luz y en un medio con nitrato ( $16 \text{ mM}$ ). Las actividades enzimáticas se determinaron en los correspondientes extractos crudos, que se prepararon, al cabo de 2 h de tratamiento con la metilamina. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

que la capacidad de inactivación in vivo de la nitrato reductasa por adición de metilamina a un cultivo de células de Chlorella depende aparentemente del nivel intracelular de catalasa, ya que en el cultivo I donde el nivel de catalasa es 6 veces más alto que en el cultivo II, la actividad NADH-nitrato reductasa prácticamente no se afectó después de tratar las células con metilamina durante 2 h. Por otra parte cuando el nivel intracelular de catalasa es bajo (cultivo II), la adición de metilamina produce una fuerte inactivación de la actividad NADH-nitrato reductasa.

Estos resultados podrían interpretarse como "protección in vivo" por catalasa contra la inactivación de la nitrato reductasa por acción de metilamina.

La interpretación de estos datos debe hacerse con lógica precaución ya que in vivo pueden intervenir muchos y distintos factores, además del nivel de catalasa, en la regulación de la nitrato reductasa. Sin embargo, consideramos importantes y significativos estos resultados ya que los hemos venido observando de forma sistemática a lo largo de nuestro trabajo.

Es interesante incluir en este apartado que no hemos hecho un exhaustivo estudio de los factores que afectan o condicionan el nivel intracelular de catalasa en células de Chlorella, sin embargo hemos observado que este nivel aumenta a medida que lo hace el número de resiembras del cultivo en medio líquido o la tensión de oxígeno a que se somete.

III.3.2.2. Inactivación in vitro de nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH, utilizando preparaciones enzimáticas con distinto contenido endógeno de catalasa

La Figura 7 recoge la cinética de inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella por preincubación aeróbica con NADH, utilizando preparaciones enzimáticas con distinto contenido endógeno de catalasa. La preparación I contenía aproximadamente doble cantidad de catalasa que la II, debido a que esta última se sometió a un paso adicional de purificación que fue una ultracentrifugación a 130.000 x g durante 120 min. Los resultados de la Figura 7 indican claramente que la preparación enzimática que más bajo contenido en catalasa tenía (Prep. II, 31 unidades de catalasa) se inactiva más rápidamente que la I (76 unidades de catalasa) probablemente debido a un efecto de protección de la catalasa endógena, y que lógicamente es más significativo en el

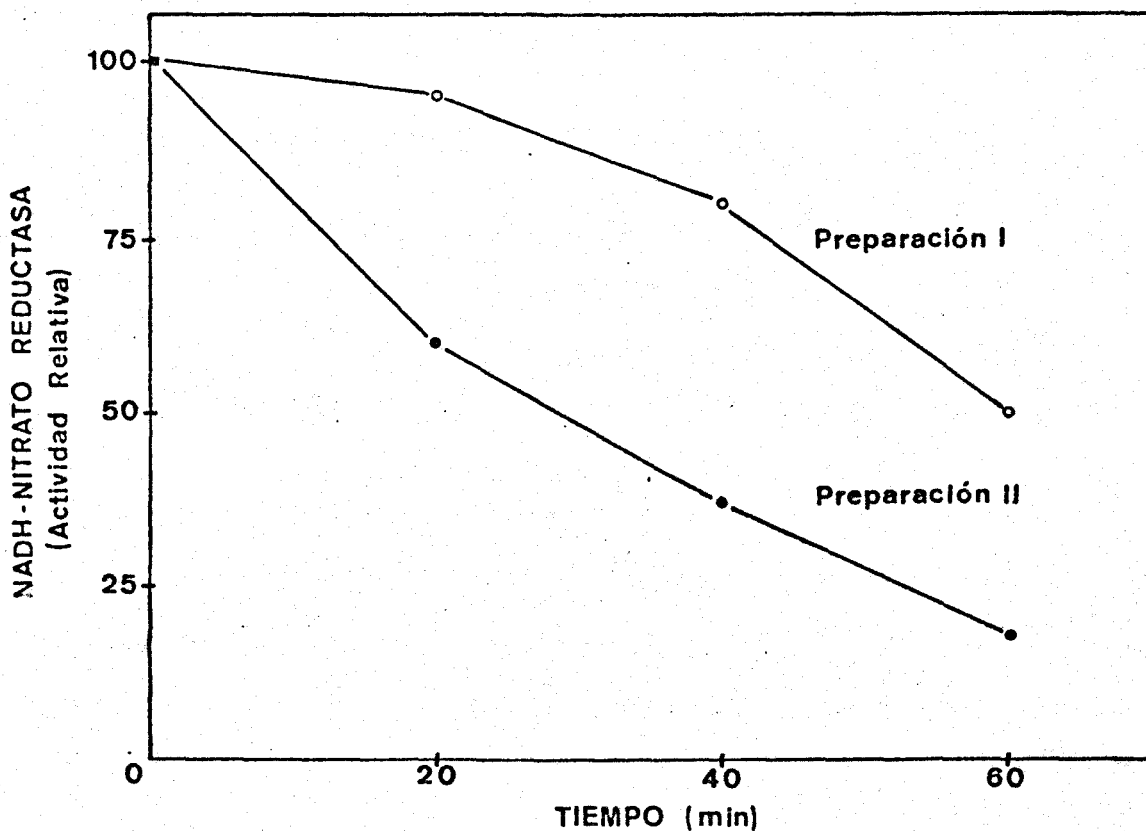


Figura 7. *Cinética de inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH, utilizando preparaciones enzimáticas con distinto contenido endógeno de catalasa.* Nitrato reductasa parcialmente purificada, 0,4 mg de proteína (la preparación II se sometió a una ultracentrifugación adicional a 130.000 x g durante 120 min, que permitió eliminar el 50% aproximadamente del contenido endógeno de catalasa) se preincubó a 0°C en un volumen final de 0,5 ml con 50  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5, y 0,15  $\mu$ moles de NADH. La actividad NADH-nitrato reductasa se midió a los tiempos indicados por adición de 0,05 ml de la correspondiente mezcla de incubación a los reactivos del ensayo standard. 100% de actividad es de 3,9 (Prep. I) y 3,5 (Prep. II) nanomoles de NADH oxidados por min. El contenido total en catalasa presente en los 0,4 mg de proteína utilizado en cada preincubación, fué en  $\Delta D.O.$  a 240 nm por min, de 0,24 (Prep. I) y 0,10 (Prep. II) respectivamente. Para más detalles ver Materiales y Métodos.

caso de la preparación I. Es interesante comparar estos efectos de inactivación in vitro por NADH, de la NADH-nitrato reductasa y que relacionamos con el nivel de catalasa endógeno, con los datos que se presentan en la Figura 6, donde catalasa exógena (7.500 unidades) prácticamente no tenía efecto protector sobre la actividad nitrato reductasa cuando se preincubaba el enzima con NADH, bajo condiciones similares. Una posible explicación lógica a estas observaciones podría ser que la catalasa endógena presentara algún tipo de asociación con la nitrato reductasa (ya que es muy difícil separarlas completamente por los métodos de purificación utilizados en este trabajo) y que esto incrementara considerablemente su efecto protector contra la inactivación de la actividad NADH-nitrato reductasa, en presencia del NADH. Por otra parte no puede descartarse la posibilidad de que existan otras influencias de tipo protector que no controlamos en estos experimentos.

### III.3.2.3. Inactivación in vitro de nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH y cianuro utilizando preparaciones enzimáticas con distinto contenido endógeno de catalasa

La Tabla XVIII muestra que cuando se utiliza NADH más  $\text{CN}^-$  como agente inactivante del enzima in vitro, el gra-



TABLA XVIII

EFFECTO DE NADH Y CIANURO SOBRE LA ACTIVIDAD NADH-NITRATO  
 REDUCTASA DE DOS PREPARACIONES ENZIMATICAS CON DIFERENTE  
 CONTENIDO ENDOGENO DE CATALASA

Mezcla de incubación	Catalasa (Unidades en mez- cla de incubación)	NADH- nitrato reductasa (%)
Preparación I	54	100
+ NADH + CN <sup>-</sup>	54	48
Preparación II	25	100
+ NADH + CN <sup>-</sup>	25	10

La nitrato reductasa se purificó parcialmente según se describe en Materiales y Métodos (la Preparación II, fué sometida a un paso adicional de purificación, con respecto a la Preparación I, que consistió en una ultracentrifugación a 130.000 x g durante 120 min). 0,45 mg de proteína de cada preparación se preincubaron separadamente en un volumen final de 0,5 ml con 50  $\mu$ moles de tampón Tris-HCl, pH 7,5; y donde se indica 0,15  $\mu$ moles de NADH y 1,25 nanomoles de cianuro potásico. Al cabo de 15 min a 0°C, la actividad NADH-nitrato reductasa se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo standard de la proteína. 100% de actividad correspondió a 9,2 (Prep. I) y 8,6 (Prep. II) nanomoles de NADH oxidados por min. La actividad catalasa de cada preparación se midió según se indica en Métodos.

do de inactivación de la actividad NADH-nitrato reductasa guarda una interesante relación con el contenido endógeno de catalasa en las preparaciones enzimáticas utilizadas. Para un mismo tiempo de incubación, bajo condiciones similares, la inactivación del enzima fue del 50% aproximadamente para el caso de la preparación I, donde el contenido en catalasa endógena era mayor (54 unidades), y del 90% en la preparación II de más bajo contenido endógeno de catalasa (25 unidades).

Análogamente a lo descrito en el párrafo anterior si comparamos estos datos (donde 54 unidades de catalasa endógena consiguen una protección del 50% de la actividad NADH-nitrato reductasa) con los obtenidos en la Tabla XIII (donde 7.500 unidades de catalasa era necesarias para proteger la nitrato reductasa solo un 50% contra su inactivación por NADH y cianuro) llegamos a una consecuencia similar a la anterior: que la catalasa endógena posee un poder protector de la nitrato reductasa contra su inactivación in vitro por NADH y cianuro, muy superior al de la catalasa exógena.

III.3.2.4. Inactivación in vitro de nitrato reductasa de *Chlorella fusca*, por preincubación con FMN (reducido químicamente por ditionito), utilizando preparaciones enzimáticas con distinto contenido endógeno de catalasa

La Tabla XIX muestra que cuando se utiliza FMN, reducido químicamente con ditionito, como agente inactivante de la nitrato reductasa de *Chlorella fusca*, el grado de inactivación de la proteína era prácticamente independiente del contenido endógeno de catalasa de la preparación enzimática utilizada. En ambos casos se consiguió inactivar el enzima un 70% aproximadamente luego de incubar las correspondientes preparaciones durante 20 min a temperatura ambiente.

TABLA XIX

EFFECTO DEL DITIONITO SOBRE LA ACTIVIDAD FNH<sub>2</sub>-NITRATO REDUCTASA  
DE DOS PREPARACIONES ENZIMATICAS CON DIFERENTE CONTENIDO  
ENDOGENO DE CATALASA

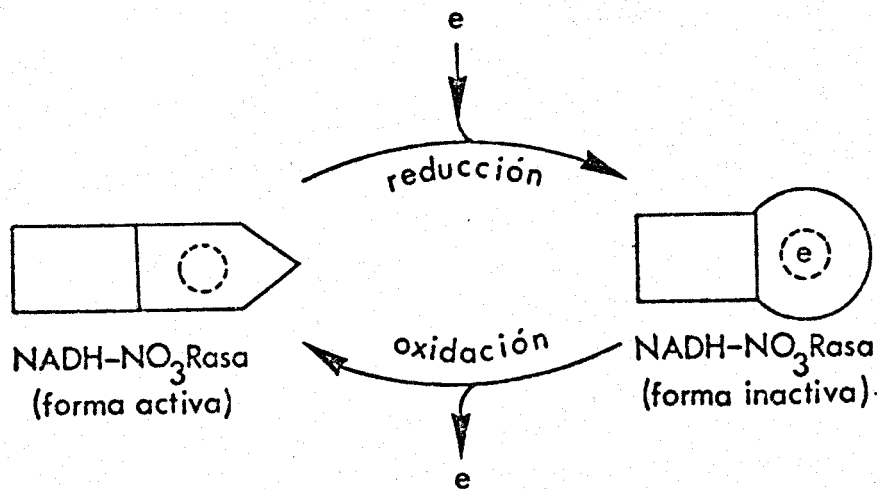
Mezcla de incubación	Catalasa (Unidades en mez- cla de incubación)	FNH <sub>2</sub> - nitrato reductasa (%)
Preparación I	76	100
+ FMN + S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	76	33
Preparación II	29	100
+ FMN + S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>=</sup>	29	26

0,4 mg de las preparaciones de nitrato reductasa utilizadas en la Figura 7, se preincubaron separadamente en un volumen final de 0,5 ml con 50 µmoles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; y donde se indica 0,1 µmol de FMN y 10 µmoles de ditionito sódico (que se añadió en 0,05 ml de una solución acuosa de 8 mg/ml de bicarbonato sódico). Al cabo de 20 min a temperatura ambiente, la actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se midió por adición de 0,1 ml de cada mezcla de incubación a los reactivos del ensayo standard del enzima. 100% de actividad correspondió a 4,5 (Prep I) y 4,1 (Prep II) nanomoles de nitrito formado por min.

La catalasa de cada preincubación se midió según se indica en Métodos.

#### IV. DISCUSION

El complejo enzimático nitrato reductasa de tipo asimilatorio está sujeto a regulación por modificación covalente de la proteína, de naturaleza redox. El sitio de esta regulación es la segunda mitad del complejo, que cataliza la reducción de nitrato propiamente dicha. El enzima puede existir en dos formas, una activa y otra inactiva. Ambas especies enzimáticas son metabólicamente interconvertibles: la forma activa se inactiva por reducción y la forma inactiva se activa por oxidación. Estas líneas resumen las características, de validez general, observadas en todas las nitrato reductasas estudiadas y que corresponden a diversos organismos como plantas superiores, algas verdes, bacterias verde-azuladas, levaduras, hongos y bacterias (16,39,61,96). Esquemáticamente puede representarse así:



En organismos fotosintéticos las investigaciones acerca de la regulación nutricional de la asimilación de nitrato han alcanzado gran desarrollo, gracias a los estudios que a nivel celular, subcelular y molecular han realizado los grupos de la Prof. Vennesland en Berlín y del Prof. Losada en Sevilla. Utilizando diferentes especie de algas verdes, Chlorella vulgaris por un lado y Chlorella fusca, Chlamydomonas reinhardi, Ankistrodesmus braunii y la bacteria verde-azulada Nostoc muscorum por otro, se han conseguido valiosísimos datos acerca del mecanismo de inactivación fisiológica de la nitrato reductasa. Discrepancias importantes en algunos de los datos experimentales obtenidos por estos grupos y una diferente interpretación de los resultados comunes, han llevado a proponer dos hipótesis sobre el mecanismo de inactivación in vivo de la nitrato reductasa, que hasta estos momentos son difíciles de unificar. Ambas hipótesis coinciden en que el estado reducido del enzima es requisito indispensable para que se pueda inactivar, pero por un lado el grupo de Vennesland piensa que el cianuro, a concentración muy baja (que por supuesto no afecta a otros procesos vitales del organismo) juega a nivel fisiológico un efecto potenciador en la inactivación del enzima (37) y por otra parte el grupo de Losada cree que es el ADP, y no el cianuro, el compuesto que po -

see in vivo este efecto potenciador (16,39).

Con las Tablas I y II del presente trabajo se pretende dar una visión conjunta, utilizando datos obtenidos por nosotros y por otros miembros de este Departamento, de los tratamientos que actualmente se conocen para inactivar in vivo o in vitro la nitrato reductasa del alga verde Chlorella fusca. Hemos estudiado especialmente las condiciones óptimas bajo las que el NADH y el ADP cooperan para inactivar in vitro la nitrato reductasa, pues se trata de un punto especialmente conflictivo con los resultados de Vennesland que no ha encontrado ningún efecto in vitro del ADP como potenciador de la inactivación por NADH de la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris (77). Los resultados recogidos en la Figura 2, muestran que para que la cooperación sea efectiva se requiere que los nucleótidos estén en la mezcla de incubación a concentraciones equimoleculares. Es difícil hasta el momento interpretar este fenómeno, pero resulta sorprendente que recientes estudios hechos con la nitrato reductasa del alga verde Ankistrodesmus braunii arrojen similares resultados (16).

Este tipo de cooperación entre NADH y ADP requiere la presencia de unos niveles mínimos de fuerza iónica (Tablas IV y V), es más favorable a pH alto, entre 8 y 9, y depende de



la naturaleza del tampón utilizado, ya que si este tampón está preparado a base de fosfato no se aprecia una cooperación significativa del ADP con el NADH (Tabla VI). Estos datos indican que han de darse unas condiciones muy peculiares para que el efecto cooperativo del ADP tenga lugar y que por tanto se trata de un tipo de regulación muy fina. Esta puede ser la razón por la que no se ha encontrado ningún efecto cooperativo del ADP en la inactivación in vitro por NADH de la nitrato reductasa purificada de Chlorella vulgaris (77), ya que en la incubación del enzima con los nucleótidos, se utilizó un tampón de fosfato potásico, pH 7,6, y no se incluyó la fuerza iónica adecuada. Por otra parte, al utilizar un enzima altamente purificado, puede ocurrir que la proteína pierda parte de sus propiedades reguladoras durante los tratamientos de purificación a que ha sido sometido.

En la Tabla I mostramos que la adición de amonio, metilamina o arseniato a un cultivo de Chlorella fusca, creciendo en la luz en una corriente de CO<sub>2</sub> en aire y con nitrato, provoca una rápida y significativa inactivación de la segunda mitad del complejo NADH-nitrato reductasa, sin que se afecte la mitad diaforasa inicial. El proceso es reversible y el enzima inactivo puede reactivarse in vivo, por eliminación del agen-

te inactivante, e in vitro, por oxidación con ferricianuro. La inactivación in vitro de la proteína requiere poder reductor (NADH) y es potenciada por ADP (39). Se explicaron estos hechos argumentando que el amonio, arseniato o metilamina, actuando como desacoplante de la fotofosforilación no cíclica produciría un incremento del flujo fotosintético de electrones y también de la concentración de ADP, que provocarían la inactivación de la nitrato reductasa (41). Sin embargo, no se habían hecho aún medidas de los niveles intracelulares de piridín-nucleótidos reducidos ni tampoco de la carga energética; por ello pensamos que un estudio acerca de este problema aportaría una sólida base experimental a nuestra hipótesis de trabajo sobre el mecanismo de inactivación de la nitrato reductasa.

Fue necesario, con tal fin, utilizar cultivos celulares muy concentrados y, como consecuencia, variar la concentración de nitrato, la intensidad de luz y la concentración del agente inactivante. Una vez fijadas estas nuevas condiciones de inactivación, se pusieron a punto los métodos adecuados para medir los metabolitos responsables del estado redox y la carga energética celular ( $\text{NAD}^+$ , NADH,  $\text{NADP}^+$ , NADPH, ATP, ADP, AMP), así como de otros metabolitos relacionados di

recta o indirectamente con los anteriores, con objeto de tener el mayor número de datos posibles sobre el estado celular, provocado por adición del desacoplante al medio de cultivo, que acompaña a la inactivación in vivo de la nitrato reductasa. La reproducibilidad de los resultados es muy buena independientemente del método de extracción usado y del método analítico empleado (Tabla VII).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por adición de metilamina va acompañada de un incremento en el nivel redox  $\left(\frac{\text{NAD(P)H}}{\text{NAD(P)}^+}\right)$  de casi tres veces (Tabla VIII) y de una disminución en la carga energética celular  $\left(\frac{\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}}{\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP}}\right)$  (8) de 0,1 unidad (Tabla IX). En un rango muy amplio de organismos se ha encontrado que profundas alteraciones del metabolismo celular se traducen en pequeñas variaciones de la carga energética (14). Similares resultados hemos obtenidos empleando amonio, en lugar de metilamina, como agente inactivante (Tablas X y XI).

Estos datos refuerzan decisivamente nuestra interpretación del mecanismo de inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella que tiene lugar por adición de amonio u otros desacoplantes de la fotofosforilación (39,41,51). El

efecto cooperativo del NADH y el ADP, observado in vitro, durante la inactivación reversible de la nitrato reductasa de Chlorella fusca, toma por tanto especial significación fisiológica con respecto a la regulación metabólica de la nitrato reductasa, ya que el fenómeno parece ser específico de estos dos nucleótidos, y no existe cooperatividad aparente entre NADH y AMP o ATP; o entre NADPH y ADP (39,41,51).

Es también importante señalar aquí, que el NADH (y no el NADPH) o el ADP, protegen casi completamente a la mitad diaforásica inicial del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca contra su desnaturalización por calor (52). Esta actividad diaforásica es, por otra parte, necesaria para que la actividad terminal del complejo se inactive por NADH. En nuestro Departamento se ha aislado un mutante del alga verde Chlamydomonas reinhardi (83), cuyo complejo enzimático nitrato reductasa no posee actividad diaforásica y ha perdido su capacidad de regulación in vivo por adición de amonio; la nitrato reductasa de este mutante tampoco se inactiva in vitro por incubación con piridín-nucleótido reducido, aunque sí lo hace cuando se utiliza metil viológeno reducido químicamente por ditionito, como agente inactivante.

En Ankistrodesmus se ha visto, que la adición de desacoplantes, como carbamil-cianuro-m-clorofenil-hidrazona (CCCP) (91) o 2,4-dinitrofenol (2), inhiben la asimilación de nitrato por el alga.

En los últimos años investigaciones a nivel fisiológico y molecular, han aportado numerosas pruebas de la regulación metabólica en la asimilación fotosintética del carbono y el nitrógeno, así como de las complejas relaciones entre ambos procesos. Aparentemente los enzimas claves de dichos procesos están sometidos a regulación reversible inducida primariamente por la luz y mediada por un cambio en el estado redox de algunos coenzimas primordiales y también por fluctuaciones en la carga energética, pH, y concentración de metabolitos fundamentales (iones, sustratos y productos) (9,41).

Los enzimas claves del ciclo reductivo de las pentosas y del ciclo de los ácidos dicarboxílicos de las plantas  $C_4$ , son reversiblemente regulados in vivo por la intensidad de la luz, siendo rápidamente activados al iluminar principalmente como resultado de un incremento de la forma reducida de algunos coenzimas fotosintéticos de tipo redox, y de la forma cargada de los adenín-nucleótidos- e inactivados en la oscuridad. La nitrato reductasa, enzima clave del sistema

reductor de nitrato, es reversiblemente regulada según una vía opuesta, i.e., se inactiva por poder reductor y ADP, según un complicado mecanismo dependiente de la luz, nitrato, amonio, oxígeno, CO<sub>2</sub> y pH (9,39,41).

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enzima que cataliza la primera reacción en el ciclo oxidativo de las pentosas fosfato, se inactiva por la luz y se activa en la oscuridad. La inactivación por la luz de esta proteína parece ser un proceso de tipo reductor, ya que el enzima se inhibe in vitro por ditiotreitol o por una alta proporción de  $\frac{\text{NADPH}}{\text{NADP}^+}$  en presencia de ribulosa-1,5-difosfato (4,36). Es interesante por tanto que la adición de metilamina o amoniaco a células de Chlorella fusca, que originan un incremento en la proporción  $\frac{\text{NADPH}}{\text{NADP}^+}$  (Tablas VIII y X), provoquen simultáneamente una inactivación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, como pone de manifiesto la acumulación intracelular de glucosa-6-fosfato (Tablas IX y XI).

La formación de pirúvico por acción de la piruvatoquinasa es una reacción dependiente de ADP que se estimula por la presencia de amonio (9). Esta activación en células de Chlorella puede deberse a un incremento en el nivel de ADP ocasionado por el amoniaco (Tabla XI) y no necesaria -

mente a una acción directa del amonio sobre el enzima. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis, ya que al añadir un desacoplante (metilamina o amonio) a células de Chlorella fusca se produce un sensible incremento en la concentración intracelular de piruvato (Tablas IX y XI), que es de casi el doble en el caso de la metilamina (Tabla IX).

Un mecanismo alternativo de inactivación de la nitrato reductasa, ha sido propuesto por Vennesland y col. (37,67) en Chlorella vulgaris. Como hemos indicado anteriormente, el modelo de regulación propuesto por este grupo se basa en la inactivación reversible del enzima reducido por cianuro, fenómeno observado in vitro (29,37,77,95). Quizás la debilidad más importante de esta hipótesis radique en la naturaleza del precursor fisiológico de cianuro. Histidina (20,21) o la oxima del ácido glioxílico dan cianuro cuando se incuban con extractos de Chlorella, bajo las condiciones adecuadas. La formación de cianuro a partir de histidina al parecer se debe a una aminoácido oxidasa, actuando conjuntamente con peroxidasa, partículas celulares, o  $Mn^{2+}$  (68,69). Solomonson y Spehar (81) proponen que el efecto combinado de  $CO_2$ ,  $O_2$  y luz sobre la inactivación reversible de la nitrato reductasa en

Chlorella vulgaris puede explicarse por la competencia de  $O_2$  y  $CO_2$  con respecto a la ribulosa difosfato en presencia de ribulosa difosfato carboxilasa-oxigenasa. Ellos asumen que el glioxilato -formado a partir de glicolato, producto de la oxidación de la ribulosa difosfato- se combina con hidroxilamina -formada cuando el nitrito se reduce en presencia de amonio (46)- para producir la oxima del ácido glioxílico.

Una importante aproximación al fenómeno de la interconversión de la nitrato reductasa, que sustentaría que el mecanismo de inactivación del enzima propuesto por nuestro Departamento puede tener una validez más general que el indicado por Vennesland, son los resultados obtenidos por Ortega y col. (61); estos autores han observado que el amonio, así como otros desacoplantes de la fotofosforilación, inhiben fuertemente la reducción fotosintética de nitrato por partículas de la bacteria verde-azulada Nostoc muscorum. El enzima que lleva a cabo la reducción de nitrato, la nitrato reductasa, puede inactivarse reversiblemente por reducción, en una reacción dependiente de ferredoxina. El nitrato protege contra esta inactivación y el oxígeno molecular restablece la actividad original del enzima. El amonio también provoca la total inhibición de la reducción fotosintética de  $NADP^+$ .



Al igual que la nitrato reductasa, la ferredoxina-NADP reductasa se inactiva reversiblemente por reducción y se reactiva por oxidación (62).

Al interrumpir la aireación de un cultivo del alga verde Chlamydomonas reinhardi, la nitrato reductasa se inactiva completamente en 15 min (44). En células de Ankistrodesmus braunii una baja tensión de oxígeno tiene poco efecto sobre el nivel de actividad nitrato reductasa (16). Por otra parte Pistorius y col. (67) han encontrado que el  $O_2$  estimula la inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris.

Estas contradicciones experimentales pueden deberse a que cuando un cultivo de células se somete a baja tensión de  $O_2$  pueden producirse múltiples modificaciones metabólicas, que provoquen un estado celular diferente según el organismo de que se trate y por ello afecten de distinta manera a la nitrato reductasa. Losada (44) piensa que la interrupción de la aireación puede contribuir a un incremento del poder reductor intracelular, que facilite la inactivación de la nitrato reductasa. Por el contrario Pistorius y col. (67) atribuyen al  $O_2$  un efecto estimulante sobre las reacciones que conducen a

la generación de cianuro. Es probable que el  $O_2$  juegue algún papel en la inactivación in vivo de la nitrato reductasa y los resultados de este trabajo indican claramente, y por primera vez, que el oxígeno tiene una función primordial en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación con NADH sólo, ó en presencia de ADP ó cianuro.

Los resultados mostrados en las Figuras 4 y 5 indican que el oxígeno es absolutamente necesario para conseguir una completa inactivación del enzima. Este requerimiento sugiere la posibilidad de que superóxido y peróxido puedan intervenir en el proceso de inactivación del enzima. Consecuentemente se ensayó, el efecto de superóxido dismutasa y catalasa en el proceso de inactivación in vitro. Los resultados recogidos en las Tablas XII, XIII y XIV indican que cuando catalasa o superóxido dismutasa se incluyen en la mezcla de incubación, la nitrato reductasa se protege casi completamente contra la inactivación por NADH, NADH más cianuro o NADH más ADP, indicando que la inactivación de la nitrato re-

ductasa, obtenida in vitro por estos tratamientos, puede estar mediada por radicales superóxido y/o peróxido. La acción de estos radicales es una etapa intermedia en el mecanismo de inactivación de la nitrato reductasa y no final, ya que el en zima inactivo no puede recuperar su actividad por tratamiento con superóxido dismutasa y/o catalasa.

Las observaciones anteriores guardan un cierto paralelismo con la inactivación in vitro de la nitrito reductasa de Neurospora crassa por preincubación con NAD(P)H en presencia de FAD (93). Sin embargo en este último caso superóxido dismutasa no tenía efecto protector y por otra parte esta inactivación in vitro de la nitrito reductasa de Neurospora crassa no era reversible, y tampoco existen datos sobre una posible regulación in vivo de este enzima (93), por todo esto se piensa que, la inactivación in vitro de la nitrito reductasa, de Neurospora crassa mediada por peróxido, no posea valor fisiológico.

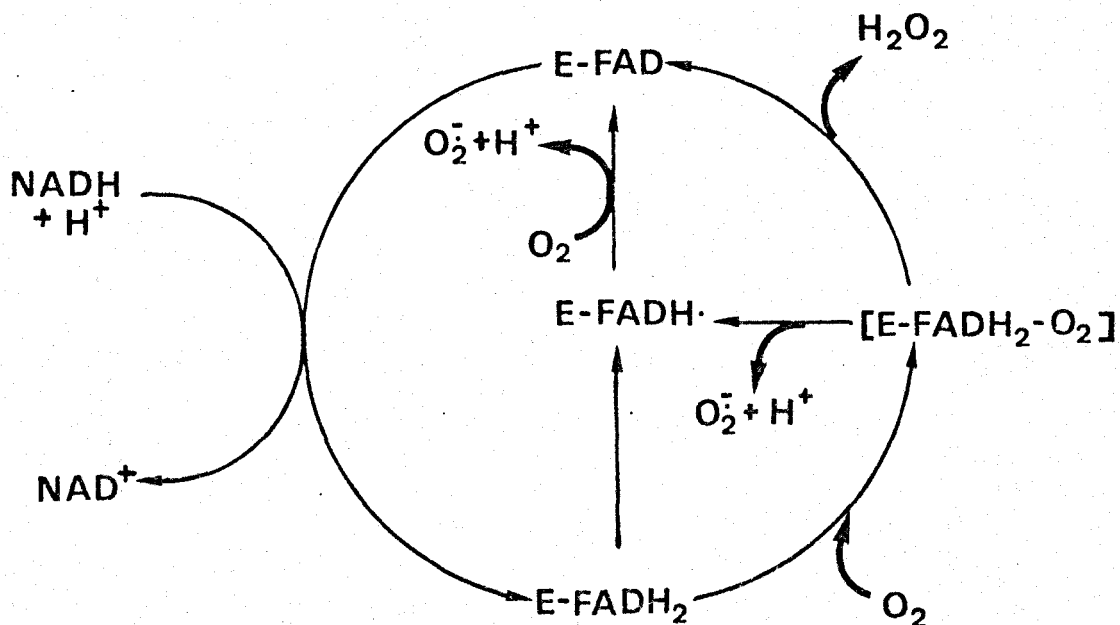
La Tabla XVI indica claramente, que el peróxido de hidrógeno coopera eficazmente con el NADH en la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella fusca.

Numerosas investigaciones se han realizado, en los últimos años acerca de la interacción de flavinas o flavoproteínas reducidas con el oxígeno molecular y han establecido la generación de radicales libres, como consecuencia de la reducción monovalente (superóxido) o divalente (peróxido) del oxígeno molecular (18,53). Es por tanto lógico pensar que si el FAD reducido -libre o combinado a la nitrato reductasa- está implicado en la formación de estos radicales que median la inactivación del enzima, por preincubación aeróbica con NADH sólo ó con ADP ó cianuro, su presencia en la mezcla de incubación de la proteína se traduciría en una estimulación del efecto inhibitor sobre la nitrato reductasa. Los resultados de la Tabla XV hablan en favor de esta hipótesis, ya que la presencia de FAD en la mezcla de incubación de la nitrato reductasa con NADH más ADP, lleva consigo un efecto estimulante en la inactivación de la proteína.

Otras flavoproteínas, como la xantina oxidasa de la leche, llevan a cabo la reducción univalente o divalente del oxígeno (18). También se producen radicales superóxido y peróxido en la oxidación de NADPH por el sistema ferredoxina, ferredoxina-NADP-reductasa, característica de organismos fotosintéticos (58). Massey y col. (54) han mostrado la parti-

cipación de superóxido en la reducción aeróbica del citocromo c por flavinas reducidas con EDTA en la luz, puesto que el proceso se inhibe por la acción de eritrocuprefina (que tiene actividad superóxido dismutasa) añadida a bajas concentraciones; este efecto inhibitor no aparece si la reacción se lleva a cabo en anaerobiosis, aunque en este último caso la reducción del citocromo c es marcadamente inferior a la que tiene lugar en presencia de oxígeno.

El superóxido y peróxido de hidrógeno se forman por interacción de la flavina reducida, química o enzimáticamente, con oxígeno molecular según el esquema siguiente, propuesto por Nakamura (58):



La inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por la adición de desacoplantes de la fosforilación no cíclica a un cultivo (Tabla I), se presenta en distinto grado, o bien dicha inactivación no tiene lugar, dependiendo de varias y a veces desconocidas modificaciones en las condiciones ambientales. La inactivación in vivo del enzima por cualquiera de los tratamientos indicados en la Tabla I no se consigue en cultivos de células, que han sufrido numerosos pasos de resiembra en medio líquido "cultivos viejos", y tenemos indicios de que el proceso de regulación de este enzima pueda estar sujeto a cambios estacionales. Buscando una explicación a estas observaciones y basándonos en la protección por catalasa contra la inactivación in vitro de la nitrato reductasa, se determinó el nivel de catalasa en un "cultivo viejo" de células de Chlorella fusca. Los resultados de la Tabla XVII muestran una interesante correlación entre el nivel intracelular de catalasa, en cultivos diferentes, y la capacidad de inactivación in vivo de la nitrato reductasa por adición de metilamina a los mismos. Un "cultivo viejo" de células, que presentaba un nivel de catalasa del orden de seis veces superior al de otro cultivo, posee una nitrato reductasa que aparentemente carece de posibilidades reguladoras por adición de desacoplantes (Tabla XVII).

Por otra parte, la catalasa endógena es mucho más efectiva en su protección contra la inactivación in vitro de la nitrato reductasa, ya que 54 unidades son suficientes para proteger un 50% a la nitrato reductasa de su inactivación por preincubación con NADH más cianuro (Tabla XVIII), mientras que para alcanzar esta misma protección por catalasa exógena, se requieran del orden de 7.500 unidades (Tabla XIII). Estos resultados parecen indicar que existe una cierta asociación intracelular entre catalasa y nitrato reductasa, que no se presenta evidentemente en el caso de la catalasa añadida; o bien, que la catalasa de Chlorella fusca es más efectiva en su protección que la catalasa comercial, obtenida de eritrocitos.

El nivel endógeno de catalasa puede depender de la intensidad de la fotorrespiración celular; pues dicho enzima elimina el peróxido de hidrógeno que se produce en los peroxisomas por oxidación de glicolato a glioxilato, dependiente de oxígeno (88). En el mecanismo de reducción de oxígeno en cloroplastos, se ha propuesto la intervención del superóxido y peróxido; en principio parece que estos radicales intervienen en la fotorrespiración y en procesos celulares que acompañan a la senescencia de plantas superiores.

(17). El sentido fisiológico de la fotorrespiración continua siendo un enigma. Algunos autores han propuesto, como posibles, su contribución a la biosíntesis de aminoácidos y a la eliminación de un exceso de poder reductor intracelular (33); por tanto un cultivo de células con una activa fotorrespiración no acumularía poder reductor suficiente para inactivar la nitrato reductasa.

Cabe la posibilidad, pues, de que en células de Chlorella fusca, la regulación de la nitrato reductasa esté mediada, en último término, por radicales del oxígeno y relacionada con el nivel intracelular de catalasa y probablemente de su peróxido dismutasa.

Debido a la fragilidad de los peroxisomas y a la fácil asociación de catalasa con otros enzimas, tanto las partículas, como los enzimas parcialmente purificados a partir de organismos con catalasa, están contaminados con dicho enzima (88). Nosotros hemos comprobado que una preparación de nitrato reductasa parcialmente purificada (Figura 7) puede presentar alto contenido de catalasa (Prep. I), eliminándose en gran parte con un tratamiento de ultracentrifugación, que permite separar un precipitado de color verde con actividad catalasa



y nitrato reductasa; el nivel de catalasa de la preparación enzimática resultante es sensiblemente menor (Prep. II).

Lips y col. (32) sugieren que enzimas de la fijación del  $\text{CO}_2$  (ribulosa difosfato carboxilasa), fotorrespiración (glicolato oxidasa) y de la asimilación del nitrato están asociados a microsomas, que se unen a los cloroplastos durante la iluminación.

La Figura 7 muestra que dos preparaciones de nitrato reductasa se comportan distintamente frente a la inhibición por NADH, dependiendo de su contenido en catalasa. Sin embargo cuando se utilizó como agente inactivante flavín-nucleótido reducido químicamente con ditionito, no se observó esta diferencia (Tabla XIX). Una explicación a estos hechos es que la nitrato reductasa se inactive in vitro por mecanismos diferentes cuando se utiliza NADH por un lado o  $\text{FNH}_2$  por otro, puesto que, en el primer caso se requiere que la diaforasa sea activa para que la inactivación tenga lugar, mientras que en el segundo caso no (40,83).

Los datos acerca del mecanismo de activación de la nitrato reductasa, previamente inactiva, son todavía más

escasos que los discutidos sobre el mecanismo de inactivación de la proteína (40).

La reactivación del enzima se consigue aparentemente por oxidación, ya que al tratar el enzima inactivo con ferricianuro -que oxida a la proteína (95)- se restaura su actividad nativa. Pero es obvio pensar que en el mecanismo de reactivación a nivel fisiológico, no está implicado el ferricianuro. Recientemente se ha publicado que la inactivación de la nitrato reductasa de Nitrobacter agilis por sobrerreducción con NADH, se revierte por oxidación del enzima reducido con  $\text{NAD(P)}^+$  (27). El enzima de otras fuentes puede reactivarse in vitro por nitrato o compuestos análogos bajo condiciones todavía no bien definidas (28,56,97). La nitrato reductasa inactiva de células de Chlorella fusca u hojas de espinacas puede activarse rápidamente por luz azul (7). Sin embargo, serán necesarios posteriores trabajos para elucidar el mecanismo preciso de reactivación de la nitrato reductasa por sustratos fisiológicos oxidantes.

Interesantes trabajos sobre el mecanismo de regulación de enzimas implicados en la asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$  por cloroplastos, se han publicado últimamente. En

123

dicho mecanismo la ferredoxina, aceptora del flujo de electrones fotosintético, activa enzimas claves del tipo de la fructosa difosfatasa. Esta activación, dependiente de ferredoxina reducida, ocurre a través de tiorredoxina, proteína transportadora de electrones; el esquema regulatorio de este enzima se cierra por la oxidación con glutatión del enzima reducido (activo) que ocasiona la inactivación del enzima en la oscuridad (101). Similares mecanismos de activación se han observado en otros enzimas de cloroplastos tales como NADP-malato deshidrogenasa y NADP-gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (31).

A la luz de estos datos parece probable que la tiorredoxina y el glutatión posean un papel general en regulación enzimática, basado en su actividad típica de óxido-reducción de grupos SH/S-S, por ello, sería de enorme interés estudiar la posible intervención de tiorredoxina y glutatión en el mecanismo de regulación de la nitrato reductasa de algas verdes y plantas superiores.

## V. CONCLUSIONES

1. La nitrato reductasa de Chlorella fusca se inactiva reversiblemente por preincubación del enzima con NAD(P)H, siendo más efectivo como agente inactivante el NADH, su donador fisiológico de electrones.
2. El ADP potencia específicamente la inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella fusca dependiente de NADH. Esta potenciación es óptima a concentración equimolecular de ambos nucleótidos y requiere un pH entre 7,5-8,5, además de niveles mínimos de fuerza iónica.
3. La adición de amoníaco o metilamina a un cultivo de células de Chlorella fusca produce la inactivación reversible del complejo enzimático NADH-nitrato reductasa, que va a su vez acompañada de un incremento del poder reductor intracelular y una considerable disminución de la carga energética. Paralelamente aumenta el nivel intracelular de glucosa-6-fosfato (debido probablemente a la inactivación in vivo del enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) y de piruvato (cuya síntesis depende directamente de la concentración intracelular de ADP).

4. Estos resultados suministran la base experimental necesaria para confirmar el mecanismo propuesto por este Departamento acerca de la inactivación in vivo del complejo NADH-nitrato reductasa de algas verdes inducida por el amoniaco, que actuando como desacoplante de la fotofosforilación no cíclica provoca un incremento en el nivel intracelular de NAD(P)H, que sólo, ó en cooperación con ADP, produce la inactivación in vivo del enzima.
  
5. Experimentos en condiciones anaeróbicas demuestran que el oxígeno es necesario para inactivar in vitro la nitrato reductasa por preincubación con NADH, en ausencia o presencia de cianuro.
  
6. La inactivación in vitro de la nitrato reductasa de Chlorella fusca por preincubación aeróbica con NADH, NADH más ADP o NADH más cianuro, se protege muy eficazmente cuando se incluye superóxido dismutasa y/o catalasa en la correspondiente mezcla de incubación. Sin embargo ninguno de estos enzimas protectores pueden hacer que la nitrato reductasa inactiva recupere su actividad original, indicando que el mecanismo de inactivación in vitro de la nitrato reductasa por los tratamientos indicados implica, como

etapa intermedia, la formación de superóxido y/o peróxido.

7. En cultivos de células de Chlorella fusca que contienen un alto nivel de catalasa, el complejo enzimático NADH-nitrato reductasa no se inactiva in vivo por adición de metilamina al medio de cultivo, indicando un posible papel de radicales del oxígeno en el mecanismo de inactivación in vivo de la proteína.

## VI. BIBLIOGRAFIA



1. Adams, H.: Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. En: Methods of Enzymatic Analysis, p. 573, (ed. H.U. Bergmeyer). New York: Academic Press 1963.
2. Ahmed, J., Morris, I.: Inhibition of nitrate and nitrite reduction by 2,4-dinitrophenol in Ankistrodesmus. Arch. Mikrobiol. 56, 219 (1967).
3. Ahmed, J., Spiller, H.: Purification and some properties of the nitrate reductase from Ankistrodesmus braunii. Plant Cell Physiol. 17, 1 (1976).
4. Anderson, L.E., Lim, T., Park, K.: Inactivation of pea leaf chloroplastic and cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase by light and dithiothreitol. Plant Physiol. 53, 835 (1974).
5. Aparicio, P.J.: Mecanismo molecular de la reducción del nitrato a nitrito por la nitrato reductasa de plantas. Tesis Doctoral, Universidad de Madrid (1971).
6. Aparicio, P.J., Paneque, A., Rodríguez-López, M., Losada, M.: Estudio de la nitrato reductasa del alga Chlorella. Anal. Aula Dei 10, 744 (1969).
7. Aparicio, P.J., Roldán, J.M., Calero, F.: Blue light photo reactivation of nitrate reductase from green algae and higher plants. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 1071 (1976).
8. Atkinson, D.E., Walton, G.M.: Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. J. Biol. Chem. 242,

3239 (1967).

9. Bassham, J.A.: Photosynthetic carbon metabolism. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2877 (1971).
10. Beevers, L., Hageman, R.H.: Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 495 (1969).
11. Chantarotwong, W., Huffaker, R.C., Miller, B.L., Gans-tedt, R.C.: In vivo nitrate reduction in relation to ni-trate uptake, nitrate content, and in vitro nitrate re-ductase activity in intact barley seedlings. Plant Phy-siol. 57, 519 (1976).
12. Chaparro, A., Maldonado, J.M., Díez, J., Relimpio, A.M., Losada, M.: Nitrate reductase inactivation and reducing power and energy charge in Chlorella cells. Plant Sci. Lett. 6, 335 (1976).
13. Chaparro, A., Relimpio, A.M., Vega, J.M.: Papel del oxí-geno en la inactivación in vitro por NADH de la nitrato reductasa. VII Congreso de la SEB, Resúmenes, p.50, Pam-plona (1977).
14. Chapman, A.G., Fall, L., Atkinson, D.E.: Adenylate ener-gy charge in Escherichia coli during growth and starva-tion. J. Bacteriol. 108, 1072 (1971).
15. De la Rosa, M.A.: Purificación del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii por

cromatografía de afinidad con sefarosa-azul dextrano. Tesis de Licenciatura, Universidad de Sevilla (1977).

16. Díez, J., Chaparro, A., Vega, J.M., Relimpio, A.M.: Studies on the regulation of assimilatory nitrate reductase in Ankistrodesmus braunii. *Planta* (en prensa).
17. Eltsner, E.F.: Mechanism of formation and possible functions of oxygen radicals in chloroplasts. En: 4<sup>th</sup> International Congress on Photosynthesis, Abstracts, p.104, Reading, U.K. (1977).
18. Fridovich, I.: Oxygen: boon and bane. *Am. Sci.* 63, 54 (1975).
19. Gewitz, H.-S., Lorimer, G.H., Solomonson, L.P., Vennesland, B.: Presence of HCN in Chlorella vulgaris and its possible role in controlling the reduction of nitrate. *Nature* 249, 79 (1974).
20. Gewitz, H.-S., Pistorius, E.K., Vöss, H., Vennesland, B.: Cyanide formation in preparations from Chlorella vulgaris Beijerinck: effect of sonication and amigdalín addition. *Planta* 131, 145 (1976).
21. Gewitz, H.-S., Pistorius, E.K., Vöss, H., Vennesland, B.: Cyanide formation in preparations from Chlorella and New Zeland spinach leaves: effect of added amino acids. *Planta* 131, 149 (1976).

22. Good, N.E.: Activation of the Hill reaction by amines. *Biochim. Biophys. Acta* 40, 502 (1960).
23. 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 (1977).
24. Guerrero, M.G., Jetschmann, C., Wölker, W.: The stereospecificity of nitrate reductase for hydrogen removal from reduced pyridine nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 482, 19 (1977).
25. Hageman, R.H., Hucklesby, D.P.: Nitrate reductase from higher plants. En: *Methods in Enzymology*, vol. 23 A, p. 491, (ed. A. San Pietro). New York: Academic Press 1971.
26. Heimer, Y.M., Filner, P.: Regulation of the nitrate assimilation pathway in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta* 230, 362 (1971).
27. Herrera, J., Nicholas, D.J.D.: Inactivation of nitrate reductase by NADH in Nitrobacter agilis. *Biochim. Biophys. Acta* 368, 54 (1974).
28. 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 (1972).

29. Hewitt, E.J.: Assimilatory nitrate-nitrite reduction. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 73 (1975).
30. Hodler, M., Morgenthaler, J.J., Eichenberger, W., Grob, E.C.: The influence of light on the activity of nitrate reductase in synchronous culture of Chlorella pyrenoidosa. *FEBS Letters* 28, 19 (1972).
31. Holmgren, A., Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A.: Photosynthetic regulatory protein from rabbit liver is identical with thiorredoxin. *FEBS Letters* 82, 351 (1977).
32. Kagan-Zur, V., Lips, S.H.: Studies on the intracellular location of enzymes of the photosynthetic carbon-reduction cycle. *Eur. J. Biochem.* 59, 17 (1975).
33. Kelly, G.J., Latzko, E., Gibbs, M.: Regulatory aspects of photosynthetic carbon metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 27, 181 (1976).
34. Kessler, E., Czygan, F.-C.: Physiologische und biochemische beitrage zur taxonomie der gattung Chlorella. *Arch.Mikrobiol.* 70, 211 (1970).
35. Lamprecht, W., Trautshold, I.: Adenosine-5'-triphosphate. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. En: *Methods of Enzymatic Analysis*, p. 543, (ed. H.U. Bergmeyer). New York: Academic Press 1963.
36. Lenzian, K., Bassham, J.A.: Regulation of glucose-6-phos

- phate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1,5-diphosphate and NADPH/NADP<sup>+</sup> ratios. *Biochim. Biophys. Acta* 396, 260 (1975).
37. Lorimer, G.H., Gewitz, H.-S., Wölker, W., Solomomson, 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 (1974).
  38. Losada, M.: The assimilatory nitrate reducing system and its regulation by ammonia in Chlorella. En: 1<sup>st</sup> International Symposium on Metabolic Interconversion of Enzymes. Outlines of the papers, p.59, S. Margherita, Italia (1970).
  39. Losada, M.: Interconversion of nitrate and nitrite reductase of the assimilatory type. En: *Metabolic Interconversion of Enzymes*, p.257, (ed. O. Wieland, E. Helmreich y H. Holzer). Berlín: Springer-Verlag 1974.
  40. Losada, M.: Metalloenzymes of the nitrate reducing system *J. Molec. Catal.* 1, 245 (1976).
  41. Losada, M.: Reducing power and the regulation of photosynthesis. En.: *Reflections on Biochemistry*, p. 73, (ed. A. Kornberg, L. Cornudella, B.L. Horecker y J. Oró). Oxford: Pergamon Press 1976.
  42. 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. 3,

- p. 1504, (ed. H. Metzner). Tübingen: H. Laupp Jr. 1969.
43. Losada, M., Arnon, D.I.: Selective inhibitors of photosynthesis. En: Metabolic Inhibitors, vol. 2, p. 559, (ed. R.M. Hochster y J.H. Quastel). New York: Academic Press 1963.
  44. Losada, M., Herrera, J., Maldonado, J.M., Paneque, A.: Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in Chlamydomonas. Plant Sci. Lett. 1, 31 (1973).
  45. 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 (1970).
  46. Loussaert, D., Hageman, R.H.: Hydroxylamine as a product of nitrite reduction. Plant Physiol. (supplement) 57, 38 (1976).
  47. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Hasselberger, F.X., Schulz D.W.: Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. J. Biol. Chem. 239, 18 (1964).
  48. Lowry, O.H., Passonneau, J.V., Rock, M.K.: The stability of pyridine nucleotides. J. Biol. Chem. 236, 2756 (1961).
  49. Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagents. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

50. Maldonado, J.M.: Regulación de la actividad del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1974).
51. 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 (1973).
52. Maldonado, J.M., Pueyo, M.C., Chaparro, A.: Propiedades reguladoras de la nitrato reductasa del alga Chlorella. Rev. Real Acad. Cie. Madrid 68, 633 (1974).
53. Massey, V., Palmer, G., Ballou, D.: On the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. En: Flavins and Flavoproteins, p. 349, (ed. H. Kamin). Baltimore: University Park Press 1971.
54. Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S.G., Howell, L.G., Engel, P.C., Matthews, R.G., Schuman, M., Sullivan, P.A.: The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 891 (1969).
55. Moreno, C.G.: Interconversión entre una forma oxidada y activa de la nitrato reductasa y otra reducida e inactiva Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1973).
56. 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 (1972).



57. Morris, I.: Nitrogen assimilation and protein synthesis. En: Algal Physiology and Biochemistry. Botanical Monographs, vol. 10, p. 583, (ed. W.D.P. Stewart). Oxford: Blackwell 1974.
58. Nakamura, S.: Initiation of sulfite oxidation by spinach ferredoxin-NADP reductase and ferredoxin system: a model experiment on the superoxide anion radical production by metalloflavoproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 41, 177 (1970).
59. Notton, B.A., Fido, R.J., Hewitt, E.J.: The presence of functional haem in a higher plant nitrate reductase. Plant Sci. Lett. 8, 165 (1977).
60. Orr, C.V.M.: The inhibition of catalase (hydrogen peroxide: hydrogen peroxide oxidoreductase, E.C.1.11.1.C) by ascorbate. En: Methods in Enzymology, vol. 18 A, p. 59, (ed. S.P. Colowick y N.O. Kaplan). New York: Academic Press 1970.
61. 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 (1977).
62. Ortega, T., Rivas, J., Cárdenas, J., Losada, M.: Metabolic interconversion of ferredoxin-nitrate reductase and NADP reductase of Nostoc muscorum. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 185 (1977).

63. Pan, S., Nason, A.: Further characterization of purified assimilatory NADPH:nitrate reductase from Neurospora crassa. Fed. Proc. 35, 1530 (1976).
64. 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 (1968).
65. Paneque, A., Del Campo, F.F., Ramírez, J.M., Losada, M.: Flavin nucleotide nitrate reductase from spinach. Biochim. Biophys. Acta 109, 79 (1965).
66. Paneque, A., Losada, M.: Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH<sub>2</sub> and NADPH<sub>2</sub>. Biochim. Biophys. Acta 128, 202 (1966).
67. Pistorius, E.K., Gewitz, H.-S., Vöss, H., Vennessland, B.: Reversible inactivation of nitrate reductase in Chlorella vulgaris in vivo. Planta 128, 73 (1976).
68. Pistorius, E.K., Gewitz, H.-S., Vöss, H., Vennessland, B.: Cyanide formation from histidine in Chlorella. A general reaction of aromatic amino acids catalyzed by amino acid oxidase systems. Biochim. Biophys. Acta 481, 384 (1977).
69. Pistorius, E.K., Vöss, H.: A D-amino acid oxidase from Chlorella vulgaris. Biochim. Biophys. Acta 481, 395 (1977).

70. Rao, K.P., Rains, D.W.: Nitrate absorption by barley. II. Influence of nitrate reductase activity. *Plant Physiol.* 57, 59 (1976).
71. Ries, S.K., Chmiel, H., 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 (1967).
72. Sawkney, S.K., Naik, M.S.: Role of light in the induction of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings. *Biochem. J.* 130, 475 (1972).
73. Schloemer, R.H., Garret, R.H.: Nitrate transport system in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* 118, 259 (1974).
74. Shen, T.-C., Funkhouser, E.A., Guerrero, M.G.: NADH- and NAD(P)H-nitrate reductases in rice seedlings. *Plant Physiol.* 58, 292 (1976).
75. Slater, T.F., Sawyer, B.: A colorimetric method for estimating the pyridine nucleotide content of a small amounts of animal tissue. *Nature* 193, 454 (1962).
76. Snell, E.D., Snell, C.T.: *Colorimetric Methods of Analysis*, p.804. New York: D. Van Nostrand Company 1949.
77. Solomonson, L.P.: Regulation of nitrate reductase activity by NADH and cyanide. *Biochim. Biophys. Acta* 334, 297 (1974).

78. Solomonson, L.P.: Purification of NADH-nitrate reductase by affinity chromatography. *Plant Physiol.* 56, 853 (1975).
79. Solomonson, L.P., Jetschmann, K., Vennesland, B.: Reversible inactivation of the nitrate reductase of Chlorella vulgaris Beijerinck. *Biochim. Biophys. Acta* 309, 32 (1973).
80. Solomonson, L.P., Lorimer, G.H., Hall, R.L., Borchers, R., Bailey, J.L.: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-nitrate reductase of Chlorella vulgaris. Purification, prosthetic groups and molecular properties. *J. Biol. Chem.* 250, 4120 (1975).
81. Solomonson, L.P., Spehar, A.M.: Model for the regulation of nitrate assimilation. *Nature* 265, 373 (1977).
82. 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 (1974).
83. Sosa, F.M.: Aislamiento y caracterización de mutantes de Chlamydomonas reinhardi afectados en su capacidad de asimilar nitrato. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1976).
84. Storey, K.B.: Properties of squid mantle adenylate kinase. Role of NADH in control of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 251, 7810 (1976).

85. Syrett, P.J., Leftley, J.W.: Nitrate and urea assimilation by algae. En: Perspectives in Experimental Biology, vol. 2, p. 221, (ed. N. Sunderland). Oxford: Pergamon Press 1976.
86. Thacker, A., Syrett, P.J.: The assimilation of nitrate and ammonium by Chlamydomonas reinhardi. New Phytol. 71, 423 (1972).
87. Tischner, R.: Zur induktion der nitrat- und nitritreduktase in wollsynchronen Chlorella kulturen. Planta 132, 285 (1976).
88. Tolbert, N.E.: Microbodies -peroxisomes and glyoxysomes. Ann. Rev. Plant Physiol. 22, 45 (1971).
89. 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 (1969).
90. Tweedy, J.A., Ries, S.K.: Effect of simazine on nitrate reductase activity in corn. Plant Physiol. 42, 280 (1967).
91. Ullrich, W.R.: Die nitrat- und nitritabhängige photosynthetische O<sub>2</sub>-entwicklung in N<sub>2</sub> bei Ankistrodesmus braunii. Planta 116, 143 (1974).
92. Vega, J.M.: Mecanismo de acción y regulación del complejo enzimático NADH-nitrato reductasa de Chlorella. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1972).

93. Vega, J.M., Greenbaum, P., Garret, R.H.: Studies on the in vitro inactivation of the Neurospora crassa assimilatory nitrite reductase in the presence of reduced pyridine nucleotides plus flavin. Biochim. Biophys. Acta 377, 251 (1975).
94. Vega, J.M., Herrera, J., Aparicio, P.J., Paneque, A., Losada, M.: Role of molybdenum in nitrate reduction by Chlorella. Plant Physiol. 48, 294 (1971).
95. Vega, J.M., Herrera, J., Relimpio, A.M., Aparicio, P.J.: NADH-nitrate réductase de Chlorella: nouvelle contribution a l'étude de ses propriétés. Physiol. Vég. 10, 637 (1972).
96. 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). Berlín: Springer-Verlag (en prensa).
97. Vennesland, B., Jetschmann, C.: The nitrate reductase of Chlorella pyrenoidosa. Biochim. Biophys. Acta 229, 554 (1971).
98. Wallace, W.: A nitrate reductase inactivating enzyme from the maize root. Plant Physiol. 52, 197 (1973).
99. Wallace, W.: Purification and properties of a nitrate reductase inactivating enzyme. Biochim. Biophys. Acta 341, 265 (1974).

100. 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 (1975).
101. Wolosiuk, R.A., Buchanan, B.B.: Thiorredoxin and glutathione regulate photosynthesis in chloroplasts. *Nature* 266, 565 (1977).
102. Wood, W.A.: Aminoacid racemases. En: *Methods in Enzymology*, vol. 2, p. 214, (ed. S.P. Colowick y N.O. Kaplan). New York: Academic Press 1955.
103. Zumft, W.G., Paneque, A., Aparicio, P.J., Losada, M.: Structural and functional role of FAD in the NADH-nitrate reducing system from Chlorella. *FEBS Letters* 9, 157 (1970).

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. Alicia Chaparro Muñoz  
titulada "Mecanismos de interacción de la actividad  
Neohormonal reducida de Chlorella fusca"

acordó otorgarle la calificación de Sobresaliente cum Laude.

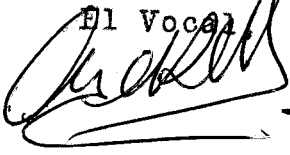
Sevilla, 1 de Febrero

1.978

El Vocal

El Vocal,

El Vocal



El Presidente,

El Secretario,

El Doctorando

F. Pico Peré

W. Loeb

Alicia Chaparro

