

011743128

TL-323

# CONTROL POSTRADUCCIONAL DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE HOJAS DE CEBADA



Trabajo de investigación presentado por el Licenciado **D. Miguel Boza Bárcenas**  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

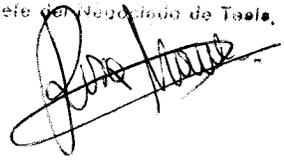
  
Sevilla 2001

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARÍA DE TESIS

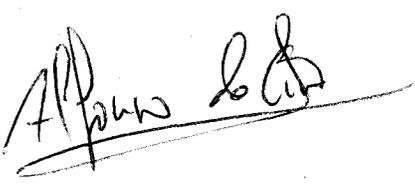
Queda registrada esta tesis doctoral  
al folio 16 número 241 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 8 de enero de 2002

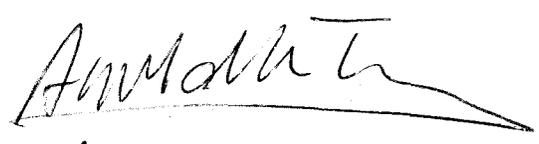
El Jefe del Departamento de Tesis.



Directores de la Tesis:



**Dr. Alfonso de Cires Segura**  
Prof. Asociado de Fisiología Vegetal



**Dr. Ángel de la Torre Casas**  
Prof Titular de Fisiología Vegetal



R. 21303



TD - 8  
323

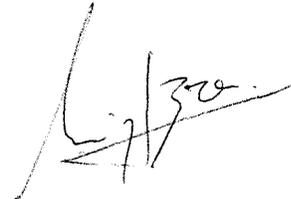
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE BIOLOGIA  
BIBLIOTECA

Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para  
que mi Tesis Doctoral CONTRIC BOSTRADUCCIONAL DE LA  
ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE HOJAS DE CEBADA.

sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

- Consulta en depósito.
- Préstamo interbibliotecario.
- Reproducción parcial.
- Reproducción total.
- Tipo de Usuarios.
- Otros términos.

Firmado:  María Barcanas Miguel.

Sevilla, a 26 de Octubre de 1992

*Para María y Pablo,  
y para mis padres y hermana.  
Por ser la causa.*

*Mis agradecimientos:*

En esta página no hay ciencia, ni trabajo, ni resultados ni compromisos, ni hay que discutir para llegar a conclusiones. Sólo hay agradecimiento. Os doy las gracias a vosotros, a todos los que un día pasasteis y estuvisteis conmigo. Todos habeis hecho de mi la persona que finalmente ha escrito una Tesis. Todos habeis contribuido a formarme como persona, como la persona que ahora tiene la oportunidad de escribir estas palabras. Las gracias se deben dar viviendo, pero no está demás escribirlo al menos una vez.

A ti Catalina, gracias porque contigo empecé a trabajar. Tu forma de vivir la ciencia y de enseñarme este mundo me entusiasmó y animó a seguir este camino. A vosotros, *fisiologos vegetales*, Cristina, Pilar, Lidia, Rosario, Ana Belén, Paco, José María y Eduardo, los compañeros con los que he compartido tanto tiempo, por todos los buenos momentos, porque habeis contribuido ha hacer de este tiempo de trabajo un periodo tan agradable, gracias.

A ti María y a ti Pablo, por ser todo, gracias. A mis padres y mi hermana, por estar siempre orgullosos, gracias. A vosotros, María del Carmen, Beatriz, Manolo y José Manuel, por vuestra confianza, gracias.

Y a vosotros, Ángel y Alfonso, gracias por haber hecho posible este trabajo. Ángel gracias por todo lo que he aprendido en este tiempo y por el valor que le has dado siempre a mi trabajo. A ti Alfonso gracias por tanto como me has dado, pero sobre todo por tu amistad, que ha influido tanto en mi vida. Gracias porque no sólo habeis dirigido mi Tesis.

*Sólo siento no saber expresarlo mejor.*

Parte de los resultados obtenidos en esta Tesis han dado lugar a varias publicaciones y se han presentado a diferentes congresos nacionales e internacionales.

## 1.- PUBLICACIONES

**Lara C, de Cires A, Boza M, de la Torre A (1995)** Carbon control of photosynthetic nitrate assimilation. En: *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, (P. Mathis ed.), vol. 5, Kluwer Academic Publishers, Dordrech, pp. 341-346.

**Boza M, de Cires A, Lara C, de la Torre A (1996)** Correlation between in vivo levels of hexose-phosphate and nitrate reductase activation in barley leaves. *Plant Physiol. Biochem. Special Issue*: 147

**Boza M, de Cires A, de la Torre A, Lara C (1996)** Glucose 6-phosphate is a positive effector of nitrate reductase activity from barley leaves. *Plant. Physiol. Biochem. Special Issue*: 146

**Boza M, de Cires A, de la Torre A, Lara C (1998)** Implicación de los azúcares-fosfato en la regulación de la actividad nitrato reductasa de hojas de cebada. En: *Avances en el metabolismo del nitrógeno: de la fisiología a la biología molecular*, (Eds.; JM Vega, PJ Aparicio, F Castillo, JM Maldonado). Servicio de Publicaciones. Universidad de Sevilla.

## 2.- CONGRESOS:

**Vth Spanish-Portuguese Congress of Biochemistry.** Salamanca, España, Septiembre, 27-30, (1994). Abstract P-VI-10

**X International Photosynthesis Congress.** Montpellier, Francia. Agosto, 20-25, (1995)

**X Congress of the Federaton of European Societies of Plant Physiology.** Florencia, Italia. Septiembre, 9-13, (1996)

**IV Reunión Nacional del Metaboismo del Nitrógeno.** Marbella, España. Febrero, 28-2 Marzo, (1997)

**XX Congreso SEBBM. Madrid, España. Septiembre, 17-20, (1997)**

**XII Reunión Nacional de la SEFV - V Congreso Hispano Luso de Fisiología Vegetal. Córdoba, España. Septiembre, 23-36, (1997)**

**Vth International Symposium on Inorganic Nitrogen Assimilation, 3rd Foths Biostress Symposium. Luso, Portugal. July, 13-17, (1998)**

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Universidad de Sevilla.

Se ha financiado con cargo a los proyectos de investigación “Regulación del metabolismo fotosintético” (PB91-0611) y “Regulación postraducciona de la nitrato reductasa en plantas herbáceas” (PB94-1191-CO2-02) de la DGICYT (Ministerio de Educación y Ciencia) y las ayudas al Grupo de Investigación “Fisiología Vegetal” (4031) del Plan Andaluz de Investigación (Junta de Andalucía).

Durante el periodo 1995-1999 he sido beneficiario de una Beca Predoctoral de la Fundación Cámara de la Universidad de Sevilla.

A todas estas instituciones agradezco la ayuda prestada.

# ÍNDICE

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Asimilación de nitrato en plantas</b>	<b>3</b>
1.1.1 Absorción de nitrato	3
1.1.2 Reducción de nitrato hasta amonio	5
1.1.2.1 Nitrato reductasa	6
1.1.2.2 Nitrito reductasa	11
1.1.3 Asimilación de amonio hasta aminoácidos	12
1.1.3.1 Glutamina sintetasa	12
1.1.3.2 Glutamato sintetasa	13
<b>1.2 Regulación de la asimilación de nitrato</b>	<b>14</b>
1.2.1 Regulación de la síntesis de la NR foliar	15
1.2.2 Regulación de la actividad	18
1.2.2.1. Sistema de interconversión redox	19
1.2.2.2 Sistema de fosforilación reversible	20
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
<b>2.1 Material biológico</b>	<b>29</b>
2.1.1. Especie utilizada	29
2.1.2. Condiciones de cultivo	29
2.1.2.1. Siembra, germinación y crecimiento	29
2.1.2.2. Soluciones nutritivas	30

<b>2.2. Suministro de solutos a la hoja por la corriente de transpiración</b>	<b>33</b>
<b>2.3. Determinación de la actividad NR en extractos de hojas</b>	<b>35</b>
2.3.1 Preparación de extractos crudos y desalados de hojas	35
2.3.2 Ensayo de actividad NR	37
2.3.3 Cálculo de las concentraciones de efectores libres en el ensayo de actividad NR	44
<b>2.4 Fraccionado con sulfato amónico de extractos crudos de hojas de cebada</b>	<b>49</b>
2.4.1. Obtención del extracto crudo	49
2.4.2. Fraccionamiento del extracto crudo con sulfato amónico	50
<b>2.5 Obtención de fracciones parcialmente purificadas de NR de hojas de cebada por cromatografía de afinidad</b>	<b>51</b>
2.5.1. Obtención del extracto crudo	51
2.5.2. Cromatografía de afinidad en azul-sefarosa	51
<b>2.6 Determinación de actividades fotosintéticas en hojas de cebada</b>	<b>55</b>
2.6.1. Análisis del intercambio de CO <sub>2</sub> y agua por espectroscopía de infrarrojo en fase gaseosa (IRGA)	55
2.6.2. Análisis polarográfico de intercambio de O <sub>2</sub>	56
<b>2.7 Determinación de los niveles de azúcares-fosfato</b>	<b>58</b>
2.7.1. Obtención de los extractos	58
2.7.2. Determinación de hexosas-fosfato	58
<b>2.8 Métodos analíticos</b>	<b>60</b>
2.8.1. Determinación de proteínas	60
2.8.2. Determinación de pH	60
<b>2.9 Tratamiento estadístico de los datos</b>	<b>61</b>

<b>2.10. Reactivos</b>	<b>63</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>64</b>
<b>3.1 Modulación in vivo de la actividad NR de hojas de cebada</b>	<b>64</b>
3.1.1 Dependencia por luz de la actividad NR y de los niveles de H6P en hojas de cebada	65
3.1.2 Dependencia por CO <sub>2</sub> de la actividad NR y de los niveles de H6P en hojas de cebada	71
3.1.3 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad NR	78
<b>3.2 Modulación in vitro de la actividad NR de hojas de cebada</b>	<b>87</b>
3.2.1 Sensibilidad a Mg <sup>2+</sup> de la actividad NR de hojas de cebada	89
3.2.2 Activación in vitro de la NR extraída de hojas de cebada por productos de la fijación de CO <sub>2</sub>	100
3.2.3 Efecto protector de los azúcares fosfato frente a la inhibición in vitro por Mg <sup>2+</sup>	114
3.2.4 Caracterización de la interacción de la NR con la G6P y con el Mg <sup>2+</sup>	128
<b>4 DISCUSIÓN</b>	<b>138</b>
<b>5 CONCLUSIONES</b>	<b>151</b>
<b>6 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>152</b>

## Abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMP	Adenosina monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albúmina sérica bovina
Cit	Citocromo
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
<i>e</i>	Electrón(es)
ES	Error estándar
FAD	Flavina adenina dinucleótido
GA	Glicolaldehído
GOGAT	Glutamato sintasa
G6P	Glucosa 6-fosfato
GS	Glutamina sintetasa
Hepes	Ácido N-(2-hidroxietil) piperacina-N'-(2-etanosulfónico)
H6P	Hexosas 6-fosfato
HR	Humedad relativa
IRGA	Analizador de gases por espectroscopía de infrarrojos
$K_{(ap)}$	Constante de estabilidad (aparente)
$K_m$	Constante de Michaelis
Man6P	Manosa 6-fosfato
MoCo	Cofactor de molibdeno de la NR
M. y M.	Materiales y métodos
NAD <sup>+</sup>	Nicotina adenina dinucleótido oxidado
NAD(P)H	Nicotina adenina dinucleótido (fosfato) reducido
NIP	Factor proteico inhibidor de la NR
NiR	Ferredoxina: NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> oxidorreductasa
NNEDA	N-(1-naftil)etilendiamina
NR	NADH:nitrato oxidorreductasa
p	Probabilidad

PF	Peso fresco
Pi	Fosfato inorgánico
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]ATP	ATP marcado radiactivamente en el fosfato en posición $\gamma$
PK	Proteína quinasa
PMS	Fenazina metosulfato
ppm	Partes por millón
p/v	Peso/volumen
PVP	Polivinilpirrolidona
RFA	Radiación fotosintéticamente activa
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UTP	Uridina trifosfato
Vi	Velocidad inicial
Vf	Velocidad final
V <sub>máx</sub>	Velocidad máxima
x	Media aritmética

## Índice de figuras

<b>Fig 1</b>	Cinética de actividad NR de hojas de cebada en luz o en oscuridad en medio base o estándar	39
<b>Fig 2</b>	Sensibilidad de la NR de hojas en luz o en oscuridad, a la G6P o el $Mg^{2+}$ , en medio base o estándar	41
<b>Fig 3</b>	Patrón de elución de proteína y actividad NR de la columna de azul-sefarosa	53
<b>Fig 4</b>	Actividad NR y niveles de H6P en hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz	66
<b>Fig 5</b>	Efecto del suministro de Glc, F6P, G6P y DHAP sobre la actividad NR y los niveles de H6P en hojas de cebada	68
<b>Fig 6</b>	Efecto del suministro de G6P y DHAP sobre la actividad NR en extractos desalados y los niveles de H6P en hojas de cebada	70
<b>Fig 7</b>	Actividad NR y niveles de H6P en hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz, en presencia o ausencia de $CO_2$	73
<b>Fig 8</b>	Actividad NR y niveles de H6P en hojas de cebada sometidas a transiciones aire-[aire libre de $CO_2$ ]-aire	75
<b>Fig 9</b>	Inhibición por $Mg^{2+}$ de la actividad NR en extractos de hojas de cebada en iluminación o en oscuridad	90
<b>Fig 10</b>	Efecto del $Mg^{2+}$ sobre la inactivación in vivo por oscuridad de la NR de hojas de cebada en función de la concentración de $Mg^{2+}$ en el ensayo	92
<b>Fig. 11</b>	Efecto del $Mg^{2+}$ sobre la cinética de actividad de la NR de hojas de cebada en iluminación en función de la concentración de nitrato	94

<b>Fig 12</b>	Efecto del $Mg^{2+}$ sobre la cinética de actividad de la NR extraída de hojas de cebada en oscuridad en función de la concentración de nitrato	97
<b>Fig 13</b>	Activación in vitro por azúcares-fosfato de la NR de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medio base	102
<b>Fig 14</b>	Reversión de la activación inducida por G6P de la NR de hojas de cebada en iluminación y oscuridad	106
<b>Fig 15</b>	Efecto de la G6P sobre la cinética de actividad de la NR de hojas de cebada en iluminación en función de la concentración de nitrato	109
<b>Fig 16</b>	Efecto de la G6P sobre la cinética de actividad de la NR de hojas de cebada en oscuridad en función de la concentración de nitrato	111
<b>Fig 17</b>	Activación in vitro por azúcares-fosfato de la NR de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medios que contienen $Mg^{2+}$ 5 mM	116
<b>Fig 18</b>	Comparación entre la activación de la NR por adición de G6P y por disminución de la concentración efectiva de $Mg^{2+}$ libre en el medio	121
<b>Fig 19</b>	Sensibilidad a $Mg^{2+}$ , en presencia y en ausencia de G6P, de la actividad NR extraída de hojas en oscuridad	123
<b>Fig 20</b>	Sensibilidad a $Mg^{2+}$ de la actividad NR de hojas de cebada en luz y en oscuridad ensayada en presencia o en ausencia de G6P	124
<b>Fig 21</b>	Activación in vitro por G6P de la NR extraída de hojas de cebada en luz y en oscuridad, ensayada en presencia o en ausencia de $Mg^{2+}$	126

**Fig 22** Efecto de la G6P y/o el Mg<sup>2+</sup> sobre la actividad NR, en extractos crudos desalados y las fracciones de SA *f*<sub>0-30</sub> y *f*<sub>30-70</sub> obtenidos de hojas de cebada en luz y en oscuridad 131

**Fig 23** Efecto de la G6P y el Mg<sup>2+</sup> sobre la actividad NR, en extractos crudos desalados y las fracciones de NR obtenidas por cromatografía de afinidad en azul-sefarosa 135

## Índice de tablas

<b>Tab. 1</b>	Composiciónen macronutrientes de las soluciones nutritivas utilizadas en los ensayos descritos en la sección 3.1.3 (Resultados)	32
<b>Tab. 2</b>	Constantes de estabilidad utilizadas en el cálculo de las concentraciones de efectores libre	47
<b>Tab. 3</b>	Concentración de efectores utilizados para obtener las condiciones de ensayo de la <i>Fig. 19</i> (apartado 3.2.3 de resultados)	48
<b>Tab. 4</b>	Efecto del suministro de GA y/o G6P sobre la activiad NR, los niveles de H6P y la fijación de CO <sub>2</sub> de hojas de cebada en iluminación	76
<b>Tab. 5</b>	Actividad NR y niveles de H6P de hojas de cebada, en diferentes condiciones fotosintéticas, tras suministrarles nitrato o amonio	79
<b>Tab. 6</b>	Actividad NR de hojas de cebada en iluminación o en oscuridad, cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno	82
<b>Tab. 7</b>	Niveles de hexosas-fosfato (H6P) en hojas de cebada en iluminación y oscuridad cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno	85
<b>Tab. 8</b>	$V_{max}$ y $K_m$ para el nitrato de la NR de hojas de cebada en iluminación, ensayada en ausencia y presencia de Mg <sup>2+</sup>	95
<b>Tab. 9</b>	$V_{max}$ y $K_m$ para el nitrato de la NR de hojas de cebada en oscuridad ensayada en ausencia y presencia de Mg <sup>2+</sup>	98
<b>Tab. 10</b>	Activación máxima y concentración para la cual se obtiene la activación semimáxima con los diferentes azúcares-fosfato	103
<b>Tab. 11</b>	$V_{max}$ y $K_m$ para el nitrato de la NR de hojas de cebada en iluminación ensayada en ausencia y presencia de G6P	110

<b>Tab. 12</b>	$V_{\max}$ y $K_m$ para el nitrato de la NR de hojas de cebada en oscuridad ensayada en ausencia y presencia de G6P	112
<b>Tab. 13</b>	Activación máxima y concentración para la cual se obtiene la activación semimáxima con diferentes azúcares-fosfato, ensayados en medio con $Mg^{2+}$ 5 mM	118
<b>Tab. 14</b>	Concentración de $Mg^{2+}$ libre en ensayos realizados en presencia de $Mg^{2+}$ 5 mM y concentraciones variables de G6P	120
<b>Tab. 15</b>	Actividad NR total de distintas fracciones obtenidas con SA de extractos de hojas de iluminación o de oscuridad	130
<b>Tab. 16</b>	Efecto de diversos azúcares-fosfato sobre la actividad NR de la fracción "nitrato reductasa parcialmente purificada" (NRp)	137

## ***I. INTRODUCCIÓN***

La materia viva contiene una gran cantidad de nitrógeno que se encuentra incorporado en sus proteínas, ácidos nucleicos y otras muchas biomoléculas. Las células vegetales pueden obtener este nitrógeno, durante su crecimiento autotrófico, de dos formas alternativas: 1) mediante la fijación de nitrógeno molecular presente en el aire; o 2) mediante la asimilación de nitrato o amonio presente en solución acuosa, en el suelo.

La fijación de nitrógeno sólo pueden llevarla a cabo ciertos procariotas y algunas plantas que forman asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno. Por el contrario, una amplia variedad de organismos (bacterias, hongos, algas y plantas superiores) poseen la capacidad de asimilar el nitrato. Por esta razón, aunque el nitrógeno molecular es mucho más abundante en la naturaleza que el nitrato, la cantidad de nitrógeno orgánico producido por asimilación de nitrato,  $2 \times 10^{10}$  toneladas/año, (Guerrero et al., 1981) es cien veces superior al producido por la fijación de nitrógeno molecular,  $2 \times 10^8$  toneladas/año (Burns y Hardy, 1975).

En la naturaleza el amonio se forma como producto final de la degradación de la materia orgánica. La acumulación de este ion en el suelo es muy escasa debido a que en suelos convenientemente aireados la acción de las bacterias nitrificantes produce su oxidación dando lugar a la formación de nitrato en el suelo. Se estima que entre el 60 y el 90% del amonio incorporado al suelo, bien por procesos biológicos, bien añadido en forma de fertilizantes, se oxida hasta nitrato al cabo de unas cuatro semanas. El amonio puede constituir la forma de nitrógeno más abundante en suelos en los que el proceso de nitrificación se ve desfavorecido, como ocurre en suelos ácidos y poco oxigenados.

El proceso de asimilación de nitrato por las plantas consta de las siguientes etapas: 1) absorción del nitrato por la raíz; 2) translocación a las partes aéreas; 3) reducción del nitrato a amonio; y 4) la incorporación de dicho amonio a esqueletos carbonados para la síntesis de aminoácidos.

En la mayoría de las plantas herbáceas la asimilación de nitrato tiene lugar en las hojas aunque en algunos casos la asimilación en las raíces puede tener mayor relevancia en las primeras fases de crecimiento (Andrews, 1986; Oaks, 1992). Sin embargo en las plantas leñosas y algunas leguminosas como la soja la asimilación de nitrato tiene lugar en las raíces.

La reducción de una molécula de dióxido de carbono al nivel de carbohidrato requiere cuatro electrones. En cambio, la conversión del nitrógeno nítrico en nitrógeno orgánico requiere un total de diez electrones: ocho de ellos se emplean en la reducción de nitrato a amonio y dos en la asimilación de este último. Teniendo en cuenta que la razón C/N en la materia seca vegetal es, por término medio de 10, puede estimarse que, en cuanto a producción de biomasa vegetal, la proporción de electrones que se requieren para la reducción de nitrato es aproximadamente de un cuarto de aquellos necesarios para la fijación de CO<sub>2</sub> (Guerrero et al., 1981).

## 1.1 ASIMILACIÓN DE NITRATO EN PLANTAS

### 1.1.1 Absorción de nitrato

En la mayoría de los suelos, el nitrógeno se encuentra fundamentalmente en forma de nitrato, debido a que el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) es rápidamente oxidado por las bacterias nitrificantes. No obstante las concentraciones de nitrato en el suelo pueden variar en un amplio margen, por lo que es necesaria la existencia de un sistema de transporte suficientemente versátil como para mantener los requerimientos de la planta en cualquier situación. El proceso de asimilación del nitrato en las plantas, por tanto, comienza con la absorción de nitrato por la raíz.

Las células de la raíz acumulan nitrato en contra de gradiente electroquímico. Cuando las raíces están inmersas en soluciones que contienen nitrato a concentraciones de 0.1 a 10 mM, las células epidérmicas y corticales de la raíz presentan concentraciones citosólicas de nitrato de 3 a 5 mM indicando la implicación de un sistema de transporte activo, ya que para alcanzar estas concentraciones internas mediante un transporte pasivo serían necesarias concentraciones externas superiores a 50 mM.

Estudios realizados con plantas de cebada cultivadas utilizando medios ricos en nitrato, muestran curvas de absorción de nitrato que presentan típicas cinéticas de tipo Michaelis-Menten. Del análisis de estas cinéticas se deduce un sistema de transporte que actúa en presencia de bajas concentraciones de nitrato (inferiores a 1 mM) y que presenta una  $K_m$  entre 0.01 y 0.1 mM. Este sistema de transporte activo parece ser dependiente de una ATP-asa del plasmalema que transporta unidireccionalmente  $\text{H}^+$  al exterior. Esto origina un gradiente

electroquímico de  $H^+$ , lo que suministra la energía necesaria para introducir  $NO_3^-$  por un mecanismo de simporte con  $H^+$  con una estequiometría de  $2H^+$  por  $NO_3^-$ , lo que produce la alcalinización del medio y la despolarización de la membrana plasmática (McClure et al., 1990; Ullrich, 1992). Las plantas que no han sido expuestas a nitrato muestran una baja velocidad de absorción. Sin embargo una vez en presencia de nitrato, al cabo de unas 3 o 4 horas, se comienza a producir la aceleración de la absorción hasta que se alcanza una velocidad máxima y constante, proceso que puede durar dos o tres días. Como esta aceleración no ocurre si, además de nitrato, se añaden inhibidores de la transcripción o de la síntesis de proteínas, se ha interpretado que este sistema de transporte es inducible por nitrato.

Además de este sistema de transporte activo, de alta afinidad e inducible por nitrato se ha puesto de manifiesto que en células epidérmicas y corticales de la raíz existe un segundo sistema de transporte, constitutivo y de baja afinidad que es operativo a partir de concentraciones de nitrato superiores a 1 mM, mostrando valores de  $K_m$  mucho más altos, de hasta 25 mM. Sin embargo, algunos autores han encontrado que este transporte obedece más bien a una cinética de tipo lineal que reflejaría una difusión pasiva del nitrato, probablemente a través de canales iónicos (Siddiqi et al., 1990; Aslam et al., 1992; Ullrich, 1992).

La concentración de nitrato en la disolución del suelo es generalmente inferior a 1 mM por lo que, salvo en situaciones de un elevado aporte de nitrato en la mayoría de las situaciones operaría básicamente el mecanismo de alta afinidad.

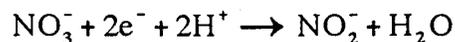
Una vez transportado al interior de la raíz, el nitrato puede ser reducido

hasta amonio e incorporado a esqueletos carbonados en este mismo órgano, almacenado transitoriamente en las vacuolas, o transportado por el xilema hasta las hojas, sitio fundamental de su asimilación en plantas herbáceas (Lewis et al., 1986, Lewis et al., 1987). Por el momento se desconoce el mecanismo de transporte de nitrato desde el xilema hasta el interior de la célula del mesófilo de la hoja.

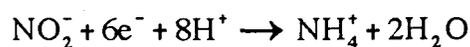
En suelos ácidos, poco propicios para las bacterias nitrificantes, el amonio constituye la forma más común de nitrógeno inorgánico asimilable, por lo que las plantas también han desarrollado sistemas de transporte de este ion al interior de la raíz. Al igual que para el nitrato, en plantas superiores también existen transportadores de amonio de alta y baja afinidad (Ullrich, 1992; Glass y Siddiqi, 1995). Una vez en la raíz, el amonio, que no es normalmente translocado por el xilema en plantas herbáceas, se asimila directamente en ella hasta aminoácidos, que pueden utilizarse directamente en la raíz, en el caso de una asimilación conjunta de amonio y nitrato, o exportarse al resto de la planta si la única fuente de nitrógeno la constituye el amonio (Lewis et al., 1986, Lewis et al., 1987)

### **1.1.2 Reducción de nitrato hasta amonio**

El nitrato se reduce a amonio en un proceso que implica dos pasos catalizados por la nitrato reductasa:



y la nitrito reductasa.



Los dos electrones necesarios para reducir el nitrato los suministra el NADH o el NADPH, mientras que los seis electrones necesarios para reducir el nitrito hasta amonio se obtienen de la ferredoxina reducida.

### **1.1.2.1 Nitrato reductasa**

La nitrato reductasa (NR; EC 1.6.6.1-3), el primer enzima en la vía de reducción de nitrato, cataliza la reducción de nitrato a nitrito dependiente de piridín nucleótidos. En plantas superiores y algas aparecen dos isoformas de nitrato reductasa: una de ellas que utiliza de forma específica NADH (NADH:NR; EC 1.6.6.1); y otra biespecífica NAD(P)H (NR; EC 1.6.6.2). Además en hongos aparece una tercera isoforma de NR que utiliza específicamente NADPH (NADPH:NR; E.C. 1.6.6.3).

La NR es un holoenzima con un peso molecular de entre 200-220 KDa y está constituido por dos subunidades idénticas de 100-110 KDa (Kuo et al., 1980; Oji et al., 1985; Wray, 1989). Cada subunidad contiene una cadena transportadora de electrones, en la que se encuentran tres cofactores, un grupo FAD, un grupo hemo tipo citocromo b (cit-b<sub>557</sub>), y un cofactor que contiene molibdeno (MoCo) (Campbell y Kinghorn, 1990; Solomonson y Barber, 1990; Reidenbaugh y Campbell, 1991; Rouze y Caboche, 1992; Crawford, 1995; Campbell, 1996). Estos tres grupos prostéticos están unidos entre sí por puentes sensibles a proteasas. Cada subunidad está formada por tres fragmentos de 28, 14 y 75 KDa que se corresponden a los dominios que contienen los cofactores FAD, hemo y MoCo respectivamente. Estudios posteriores, en los que se ha trabajado con la secuencia de aminoácidos de la NR han puesto de manifiesto que estas regiones de unión a

cofactores se encuentran alineadas en la secuencia (Campbell y Kinghorn, 1990; Solomonson y Barber, 1990; Rouze y Caboche 1992; Campbell, 1996) lo que se ha demostrado por comparación con las secuencias de otras proteínas con una funcionalidad claramente definida. Así se ha determinado que la región N-terminal de la NR es similar a la secuencia de unión al cofactor de Mo del enzima sulfito oxidasa de mamíferos (EC 1.8.3.1); la zona central de la NR coincide con el Cit b<sub>5</sub> de plantas y mamíferos; y la región C-terminal es similar a la Cit b<sub>5</sub> reductasa de mamíferos (EC 1.6.2.2). Estos datos junto con los últimos resultados obtenidos, sobre la conformación tridimensional de la NR, han permitido determinar que la NR está construida como una estructura estable tanto catalítica como funcionalmente, formada por diferentes módulos (Quinn et al., 1994; Quinn et al., 1996; Trimboli et al., 1996; Ratnam et al., 1997; Shiraishi y Campbell, 1997); y que realmente está constituida por cinco dominios estructurales (Campbell, 1999), que serían: 1) dominio del cofactor de Molibdeno; 2) zona de interacción del dímero; 3) Citocromo b; 4) zona de unión al FAD; y 5) zona de unión al NAD(P)H.

La NR actúa como un sistema redox que posee en su interior una cadena transportadora en la que se transfieren dos electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato a través del FAD, Fe y Mo que se van oxidando y reduciendo cíclicamente. Los potenciales redox para el FAD, hemo-Fe y el cofactor de molibdeno son -272 a -287 mV, -123 a -174 mV y -25 a +15 mV, respectivamente (Ratman et al., 1995; Campbell, 1996; Hille, 1996; Trimboli et al., 1996; Ratnam et al., 1997; Barber et al., 1997; Campbell, 1999). Recientemente se ha puesto de manifiesto que estos potenciales redox se mantienen gracias a la presencia de determinados residuos que interaccionan con los cofactores, de forma que la modificación en el entorno

de los mismos puede producir la variación de estos potenciales redox y por lo tanto afectar a la actividad NR. El sitio de unión del donador de electrones se encuentra en el extremo carboxi-terminal de la proteína mientras que la reducción de nitrato a nitrito tiene lugar en el extremo amino-terminal.

Durante la actividad catalítica de la nitrato reductasa, se produce el flujo de electrones desde el NAD(P)H al nitrato. Además de esta actividad, que es la fisiológica, la nitrato reductasa posee una serie de actividades parciales en las que sólo intervienen parte de los grupos prostéticos del enzima. Estas actividades parciales catalizadas por la NR han sido muy útiles en el estudio de la bioquímica del enzima. Estas actividades parciales son dos: a) actividad diaforasa, que implica la reducción de diversos aceptores artificiales de electrones tales como el ferricianuro o el citocromo c oxidado, sin la participación del MoCo; y b) actividad terminal reductora de nitrato, la cual reduce el nitrato a nitrito con diversos sistemas donadores de electrones a un nivel posterior al dominio del FAD. Varios compuestos inhiben de forma específica cada una de dicha actividades parciales. Así, la actividad diaforasa se inhibe por reactivos de grupos sulfidrilos, como la N-etilmaleimida o el p-hidroximercuribenzoato, mientras que la actividad terminal es inhibida por cianuro, anión superóxido o acetileno.

La mayor parte de las NR de plantas superiores estudiadas presentan su óptimo de actividad a un pH de 7,5. Los valores de  $K_m$  varían entre las diferentes especies, aunque en las preparaciones de NR purificada los valores más frecuentes oscilan entre 50 y 100  $\mu\text{M}$  para el nitrato y entre 1 y 5  $\mu\text{M}$  para el NADH (Guerrero et al., 1981; Cambell, 1989; Dwivedi et al., 1994; Trimboli y Barber, 1994 ; Barber et al., 1997; Ratnam et al, 1995; Ratnam et al, 1997; Su et al., 1997; Lillo et

al., 1997). Se han encontrado valores muy superiores a éstos para otras isoformas del enzima o bien por acción de inhibidores. Así para la isoforma constitutiva de NADH:NR de soja la  $K_m$  para  $\text{NO}_3^-$  es de 15 mM mientras que en presencia de ácido alantoico 200  $\mu\text{M}$ , esta  $K_m$  se incrementa hasta 60 mM (Li y Gresshoff, 1990).

La localización intracelular de la nitrato reductasa de plantas superiores no se ha establecido con claridad aunque existen varias pruebas que indican una localización citosólica (Dalling et al., 1972; Harel et al., 1977; Wallsgrove et al., 1979; Beevers y Hageman, 1980; Vaughn y Campbell, 1988). Sin embargo la localización extracitoplasmática también se ha descrito en algunos casos. Así la NR foliar de espinaca se ha localizado exclusivamente en el cloroplasto (Kamachi et al., 1987), mientras que Roldán et al., (1987) la ha localizado tanto en el citoplasma como en el cloroplasto. En hojas se ha planteado varias veces la existencia de formas de NR unidas a membrana, sin embargo siempre esta fracción ha sido significativamente menor que aquella que aparece en la fracción soluble. No obstante en células de raíz sí se ha localizado con claridad en la membrana. lo que se ha interpretado como una implicación en el sistema de transporte de nitrato (Ward et al., 1988; Ward et al., 1989).

La NR ha sido caracterizada también a nivel genético. Los primeros mutantes deficientes en NR en plantas superiores se aislaron en *Arabidopsis thaliana* (Oostindier-Braaksma y Feenstra, 1973), seguida de la identificación de mutantes deficientes en NR en tabaco (Mendel y Muller, 1976; Muller y Grafe, 1978; Mendel y Muller, 1979,) y cebada (Warner y Kleinhofs, 1977). En plantas se identifican varios genes estructurales del apoenzima de la NR y a los que se

denomina comúnmente genes nia y particularmente en cebada genes nar. Muchos de estos genes nia o nar se han clonado y secuenciado en varias especies (Wray, 1989). El análisis genético de los mutantes confirma que el número de genes nia varía en las diferentes especies estudiadas. Se conoce la secuencia completa de los genes de la NR de Arabidopsis, cebada, soja, tabaco, tomate, espinaca, calabaza y arroz. Los genes contienen entre 3 y 5 Kb. En hojas de tomate, tabaco y arroz la organización general de estos genes es muy similar; su secuencia está interrumpida por tres intrones de tamaño variable pero localizados en posiciones muy conservadas de una especie a otra (Daniel-Vedèle et al., 1989). El análisis de la secuencia genómica de la NADH:NR (nar 1) de cebada muestra la presencia de un único intrón de 1,6 Kb y dos exones de 1170 y 1578 pb. La localización de este intrón en cebada corresponde a la localización del segundo intrón del resto de las especies mencionadas. Por otra parte la región codificante del gen de la NAD(P)H:NR en cebada es de un tamaño algo menor que el de la NADH:NR. Este gen posee dos pequeños intrones de 118 y 116 pb y tres exones de 964, 141 y 1568 pb. Los intrones están localizados en la misma posición que los dos primeros intrones del gen de la NADH:NR de tomate (Kleinhofs y Warner, 1992). Además de los genes nia, se han aislado y caracterizado otros genes implicados en la biosíntesis del MoCo, y a los que se denomina comúnmente genes cnx, o en cebada, genes nar.

Hoy en día hay más de 50 secuencias de la NR en GenBank en la que se incluyen un gran número de NR de plantas superiores, algas y hongos. A partir del gran número de clones y secuencias tanto de ADN como de ADNc se ha conseguido una amplia base de datos de secuencias de aminoácidos deducidas (Rouze y Caboche, 1992; Crawford, 1995; Campbell, 1996). Además, lograr la

expresión de la NR en forma de recombinantes, (Su et al., 1996; Su et al., 1997) ha permitido trazar nuevas líneas de investigación. Estos sistemas recombinantes se han utilizado para obtener mutantes deficientes en la actividad, total o bien parcial de la NR (González et al., 1995; Nussaume et al., 1995; Schondorf y Hachtel, 1995; Dawson et al., 1997; Lejay et al., 1997; Scheible et al., 1997).

#### **1.1.2.2 Nitrito reductasa.**

La nitrito reductasa (NiR; ferredoxina-nitrito oxidorreductasa, EC 1.7.7.1) cataliza la reducción de nitrito a amonio en una reacción de transferencia de seis electrones en la que no se liberan formas intermediarias. La nitrito reductasa de plantas es un polipéptido monomérico de masa molecular entre 61 y 63 KDa. Se ha demostrado que posee como grupos prostéticos redox, un centro sulfoférico (4Fe-4S) y un sirohemo. Ambos grupos prostéticos, unidos entre sí por un átomo de azufre de una cisteína, forman parte del centro activo de la nitrito reductasa (Ip et al., 1990).

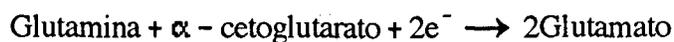
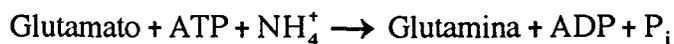
La nitrito reductasa es un enzima que se localiza en los cloroplastos de los tejidos fotosintéticos y en los plastidios de aquellos tejidos que no lo son. La reducción de nitrito depende directamente del transporte fotosintético de electrones para el suministro de la ferredoxina reducida. En tejidos no fotosintéticos, su donador de electrones es una proteína parecida a la ferredoxina de hojas que es reducida por una NADPH-ferredoxina reductasa con NADPH generado en la vía de las pentosas fosfato (Suzuky et al., 1985).

A diferencia de lo que ocurría con el amplio rango de plantas mutantes que carecían de actividad NR, los mutantes que carecen de NiR han sido más difíciles

de aislar. Esto se debe, en parte, a la naturaleza tóxica del nitrito, que produce problemas graves en el metabolismo celular. En espinaca y maíz se han caracterizado clones de ADNc de NiR.

### 1.1.3 Asimilación de amonio hasta aminoácidos.

La asimilación de amonio en la hoja, independientemente de su origen (e.g. fotorrespiración, degradación proteica, reducción de nitrato, transporte desde la raíz), ocurre mediante las reacciones catalizadas por los enzimas de la ruta de la glutamina sintetasa-glutamato sintasa (GS/GOGAT) que consta de dos reacciones:



#### 1.1.3.1 Glutamina sintetasa.

La Glutamina sintetasa (GS; L-glutamato:amonio ligasa; EC 6.3.1.2) cataliza la incorporación, dependiente de ATP, de amonio a una molécula de glutamato para producir glutamina. Este enzima presenta una  $K_m$  muy baja para el amonio ( $K_m$  entre 3 y 5  $\mu\text{M}$ ) y aparece en todos los tejidos vegetales.

La GS de plantas superiores es una proteína octamérica con un peso molecular de 350-400 KDa. En hojas, se han aislado dos isoenzimas que se localizan en el citoplasma (GS1) y en el cloroplasto (GS2). La proporción en la que aparecen cada una de estas isoformas varía en las diferentes especies estudiadas y parece estar en función del estado de desarrollo del tejido. La comparación inmunológica entre ambas isoenzimas ha demostrado un cierto grado de similitud

estructural ya que son reconocidas de forma cruzada por anticuerpos policlonales. El análisis de la secuencia de aminoácidos estima la homología de secuencias de las isoenzimas del citosol y del cloroplasto en torno al 75%. La GS2 es la responsable de la asimilación primaria de amonio (Lea y Miflin, 1974), mientras que la GS1 es la encargada de la reasimilación del amonio fotorrespiratorio. En la raíz existe una sola isoforma de glutamina sintetasa (Gsr) localizada en el citosol (Lea et al., 1992)

### **1.1.3.2 Glutamato sintasa.**

Este enzima es el responsable de la transferencia del grupo amido de la glutamina al  $\alpha$ -cetoglutarato para dar dos moléculas de glutamato, una de las cuales se reutilizará en esta reacción. Existen dos formas diferentes de glutamato sintasa en plantas superiores, que se diferencian en la fuente de poder reductor que utilizan así como en su localización. Una de ellas utiliza ferredoxina reducida como fuente de poder reductor, la L-glutamato:ferredoxina oxidorreductasa, transaminante (EC 1.4.7.1) y se localiza en el cloroplasto. La otra utiliza como fuente de poder reductor NADH, la L-glutamato:NAD<sup>+</sup> oxidorreductasa, transaminante (EC 1.4.7.14). La glutamato sintasa dependiente de ferredoxina es una flavoproteína hierro-azufre constituida por un único polipéptido de 140-165 KDa. El enzima dependiente de NADH es un monómero con un peso molecular de 200 KDa, aparece en muy bajas concentraciones en la hoja mientras que constituye la actividad predominante en raíces.

A partir de glutamato y glutamina y por acción de las transaminasas se cataliza la transferencia del grupo amino y así se da lugar a los diferentes aminoácidos.

## 1.2 REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO

Los niveles de nitrito reductasa en los tejidos suelen ser bastante más elevados que los de nitrato reductasa para asegurar que no se acumule nitrito y evitar así su toxicidad. Además si se produce nitrito en exceso este nitrógeno se puede perder hacia las zonas colindantes, especialmente en las células de la raíz (Botrel et al., 1996), ya que el  $\text{HNO}_2$  disociado atraviesa con facilidad las biomembranas. La reducción de nitrato a nitrito es, por tanto, la etapa limitante en la reducción asimilativa de nitrato (Beevers y Hageman, 1969) y por tanto la regulación de NR se hace de vital importancia para controlar la asimilación de nitrato hasta amonio. Probablemente ésta sea la razón por la que la nitrato reductasa se halle sometida a mecanismos de regulación más sofisticados que la nitrito reductasa (vease Mackintosh y Meek, 2001; Kaiser y Huber, 2001).

Además, hay algunos datos que indican que reducción de nitrato puede producir el aumento de las emisiones de NO (Rockel et al., 1996; Yamasaky y Sakihama, 2000; Mackintosh y Meek, 2001), vía descomposición del nitrito (Klepper, 1990). Aunque estas emisiones de NO son despreciables frente al total de nitrógeno asimilado por la planta, se ha postulado que este gas podría estar actuando como señal entre los diferentes órganos de la planta.

La capacidad para reducir nitrato de una planta depende de varios factores: la disponibilidad de sustratos en el citoplasma; concentraciones en equilibrio dinámico de nitrato y NAD(P)H; el nivel de NR funcional (Galangau et al., 1988; Long et al., 1992; Li y Oaks, 1993; Vicentz et al., 1993; Lin et al., 1994; Huber et al., 1994a; Kaiser y Huber, 1997); y estado de activación de la NR (Beevers y

Hageman, 1969; Guerrero et al., 1981; Kaiser y Huber, 1994; Campbell, 1996; Campbell, 1999). Cada uno de estos procesos se regula de forma directa o indirecta en función del estado metabólico de la planta gracias a la intervención de diferentes sistemas que permiten coordinar la asimilación de nitrógeno con el aporte de esqueletos carbonados y prevenir de esta forma el envenenamiento por nitrito (Provan y Lillo, 1999)

### **1.2.1 Regulación de la síntesis de la NR foliar.**

La nitrato reductasa es una proteína con una vida excepcionalmente corta, siendo su vida media tan sólo de algunas horas. Este es el motivo por el que la síntesis del enzima es muy elevada y por lo que su inducción foliar juega un papel fundamental en la regulación de la actividad NR. Recientemente se han llevado a cabo estudios detallados sobre este sistema de control utilizando plantas de tabaco (Scheible et al., 1997).

El gen de la NR es inducible por sustrato en muchas especies vegetales, aunque hay algunas excepciones tales como la soja que presenta formas de la NR tanto constitutiva como inducibles. En plantas sometidas a tratamientos cortos (algunos minutos) de inducción por nitrato, se produce el aumento de los niveles de ARNm-NR (Cheng et al., 1986; Meltzer et al., 1989). Estos niveles tras un corto período de lag alcanzan en pocas horas un nivel estacionario (Crawford, 1995; Rouce y Caboche, 1992; Solomonson y Barber, 1990). Esta inducción por nitrato se desencadena para valores de sustrato tan bajos como 50  $\mu\text{M}$ . La respuesta de la NR frente a nitrato es debida a una proteína “sensora de nitrato” que se produce de forma constitutiva, y no caracterizada aún, que se une a una región reguladora

de los genes de la NR favoreciendo la transcripción de los mismos (Redinbaugh y Campbell, 1991). Actualmente se conoce esta región reguladora del promotor del gen de la NR (Hwang et al., 1997).

El suministro de clorato a plantas de *Arabidopsis thaliana* cultivadas en amonio produce el incremento de ARNm-NR debido a la unión del clorato con el receptor al que se une el nitrato. En hojas la inducción de la NR por nitrato requiere además la existencia de cloroplastos funcionales, en este sentido se ha propuesto que la síntesis de este enzima en el citoplasma requiere un factor que se forma en los cloroplastos. Esta hipótesis se sustenta en que no se produce la inducción de la nitrato reductasa en los siguientes casos: en especies mutantes que carecen de ribosomas cloroplastídicos; en presencia de inhibidores específicos de la síntesis de proteínas en los cloroplastos; y cuando los cloroplastos son parcialmente dañados mediante un tratamiento fotooxidativo. Esta regulación coordinada de un enzima citosólico por señales procedentes del cloroplasto debe tener como misión evitar la producción de nitrito si la actividad NiR presenta alguna deficiencia.

El nitrito también produce la inducción de la NR en algunas especies vegetales como la cebada, sin embargo, probablemente el agente activo sea el nitrato producido por la oxidación del nitrito a nitrato en el tejido vegetal (Aslam et al., 1987; Aslam y Huffaker, 1989).

Además de la respuesta a esta señal primaria, las cantidades de ARNm-NR responden a otras señales que coordinan la reducción de nitrato con la fotosíntesis, el metabolismo del carbono y los ciclos circadianos así como una serie de factores genéticos. Desde hace tiempo se conoce que la luz juega un importante papel en la

regulación de la NR y la asimilación de nitrógeno en plantas superiores (Beever y Hageman, 1969). Es evidente que la máxima inducción del ARNm-NR requiere condiciones de luz que permitan producir esqueletos carbonados. El efecto de la luz sobre la NR es complejo y debe involucrar fotoreceptores como el fitocromo, pigmentos sensibles a luz azul, así como productos procedentes de la fotosíntesis (Duke y Duke, 1984; Heldt, 1997). La regulación de la inducción por luz es más evidente en tejidos etiolados pero también ocurre en tejidos verdes. Se produce una inducción prácticamente total de la NR de plantas a las que se les ha suministrado de forma exógena la fuente adecuada de esqueletos carbonados incluso cuando han sido cultivadas en condiciones de oscuridad.

Además los niveles de Gln libre y su relación frente a Glu también actúan como metabolitos clave en la regulación de los niveles de ARNm-NR en la planta (Solomonson y barber, 1990; Rouze y Caboche, 1992; Crawford, 1995; Scheible et al., 1997). Cuando los niveles de Gln son bajos y hay nitrato disponible se produce la inducción de la NR, mientras que niveles elevados de Gln disminuyen la cantidad de NR. Como era de esperar, en plantas transgénicas en las que el ARNm-NR se expresa de forma constitutiva y se ha eliminado la regulación postraduccional por eliminación de la región N-terminal de la NR, el control ligado a la relación Gln/Glu se pierde, quedando el control de la reducción de nitrato vinculado únicamente a la disponibilidad de NADH (Nussaume et al., 1995; Lejay et al., 1997)

Posiblemente en los promotores del gen de la NR existan regiones reguladoras capaces de responder al estado hídrico de la planta, fotosíntesis, condiciones de luz, relación Gln/Glu u otras condiciones limitantes para la planta (Redinbaugh y

Campbell, 1991; Crawford, 1995). Estas señales se integrarían junto con la respuesta por nitrato, mediante sus proteínas específicas de unión a ADN, y actuarían sobre los niveles de transcripción génicos.

La traducción del ARNm acumulado en el citosol también es un punto susceptible de regulación aunque hasta ahora no ha sido estudiado con detalle. Además la NR es plegada mediante la intervención de varias chaperonas aunque no se ha identificado ninguna específica para la NR. El Molibdeno probablemente se transporta en la planta a través de un sistema transportador de fosfato por lo que no es probable que pueda ser limitante. La biosíntesis de la Molibdopterina requiere la intervención del producto de siete genes, pero todos ellos se expresan de forma constitutiva y probablemente no condicionada por la presencia de nitrato (Mendel, 1997).

En resumen la clave del mecanismo de regulación a nivel de la expresión génica y por tanto de la reducción de nitrato está en la coordinación de la demanda por parte de la raíz de nitrógeno, la disponibilidad de nitrato y esqueletos carbonados y el apropiado funcionamiento de los cloroplastos.

### **1.2.2 Regulación de la actividad**

En los últimos diez años se ha puesto de manifiesto que la oscuridad o limitación de la fijación de CO<sub>2</sub> disminuye la actividad NR foliar de diversas especies. Además se ha demostrado que estas variaciones en la actividad no se deben a la síntesis o degradación de la NR sino a la regulación postraducciona l de la actividad enzimática (Riens y Heldt, 1992).

Recientemente se han llevado a cabo investigaciones encaminadas a determinar la posible influencia del fitocromo sobre la regulación postraducciona de la NR. Estos trabajos, llevados a cabo en cebada maíz y Lemna han puesto finalmente de manifiesto que el fitocromo está implicado en la expresión de la NR pero no en su regulación postraducciona (Appenroth et al., 2000). Por tanto hasta la fecha únicamente se han descrito dos mecanismos de regulación postraducciona de la actividad NR: interconversión redox y fosforilación reversible.

#### **1.2.2.1. Sistema de interconversión redox**

Los estudios sobre la regulación postraducciona de la NR se llevaron a cabo por primera vez en algas, en las que se puso de manifiesto la implicación de un sistema de interconversión redox en la inactivación reversible de la NR. El enzima, en respuesta a diferentes situaciones fisiológicas aparecía en dos formas de activación interconvertibles; una de ellas oxidada (forma activa) y otra reducida (forma inactiva) (Guerrero et al., 1981; Solomonson y Barber 1990).

Diferentes condiciones ambientales, como la disponibilidad de nitrato, la luz, el CO<sub>2</sub>, o el O<sub>2</sub> regulan la actividad NR a través de este sistema de interconversión redox. En extractos crudos de *Chlorella vulgaris*, alga en el que se ha caracterizado en detalle este mecanismo de interconversión redox (Vennesland y Jetsmann, 1971; Solomonson y Vennesland, 1972; Solomonson, 1974), tanto el NAD(P)H como el cianuro inactivan al enzima. En estas condiciones se puede inducir la reactivación de la NR por ferricianuro (Solomonson, 1974; Guerrero et al., 1981).

Trabajos llevados a cabo en plantas superiores han puesto de manifiesto que la NR foliar se regularía por un mecanismo similar de interconversión redox. La NR parcialmente purificada de hojas de diversas especies se inhibe por cianuro y NADH (Palacián et al., 1974; Aryan et al., 1983; Echevarría et al., 1984). Concentraciones de 10  $\mu$ M de NADH son suficientes para producir la inhibición de la NR parcialmente purificada de hojas de trigo. En este caso la presencia de nitrato en los medios de ensayo protege a la NR frente a esta inactivación por NADH (Aryan et al., 1983). Esta inactivación de la NR se revierte in vitro por ferricianuro, luz azul,  $Mn^{3+}$  o  $H_2O_2$  (Palacián et al., 1974; Aryan et al., 1983; Echevarría et al., 1984; Maldonado et al., 1980; Vargas et al., 1987).

#### **1.2.2.2 Sistema de fosforilación reversible**

Aunque en condiciones ambientales en un ciclo normal día/noche los cambios en iluminación son graduales, experimentalmente se utilizan cambios bruscos de iluminación ya que han resultado ser una herramienta útil para estudiar las respuestas metabólicas a la luz. En estas condiciones se produce la inactivación por oscuridad de entre un 50 y un 85% en un tiempo medio de entre 2 y 15 minutos de la NR foliar de plantas como *Arabidopsis thaliana* (Su et al., 1996), calabaza (Lillo et al., 1994; Lillo et al., 1997), cebada (Aslam et al., 1979; de Cires et al., 1993a y b; de Cires et al., 1996), espinaca (Huber et al., 1992a y b; Kaiser et al., 1992; Kaiser y Huber, 1994; Huber y Kaiser 1996; Lillo et al., 1997), maíz (Merlo et al., 1995; Xiu y Oaks 1995) y tabaco (Nussaume et al., 1995; Lejay et al., 1997; Lillo et al., 1997). La pérdida de la actividad NR foliar también se produce cuando se limita o inhibe la fijación de  $CO_2$ , lo que se ha puesto de manifiesto para la NR de hojas de cebada (de Cires et al., 1993a, de Cires, 1996), espinaca (Kaiser y Föster,

1989; Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991), *Plantago major* (Fonseca et al., 1997) y tabaco (Ferrario et al., 1997; Lejay et al., 1997).

Ya en los primeros trabajos fue evidente la inactivación in vivo por oscuridad de la NR de hojas de espinaca sólo se detectaba en presencia de concentraciones milimolares de  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  (Kaiser y Spill, 1991; Huber et al., 1992b; Kaiser y Huber, 1994; Huber y Huber, 1995). En otras especies vegetales se han obtenido resultados similares (Huber et al., 1994b; de Cires, 1996). Esto se interpretó en el sentido de que en el proceso de inactivación in vivo por oscuridad se produce un aumento de la sensibilidad del enzima a la inhibición por iones divalentes, incluso se llegó a definir el estado de activación de la NR como la relación que existe entre la actividad ensayada en presencia de  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  y la actividad ensayada en ausencia de los mismos y presencia de agentes quelantes. En un principio se pensó que el  $Ca^{2+}$  podría estar actuando como mensajero secundario, en la inactivación de la NR, puesto que esta misma función del  $Ca^{2+}$  se había descrito en otros procesos de regulación en plantas (Roberts y Harmon 1992), sin embargo la NR no presenta los niveles de sensibilidad a  $Ca^{2+}$  característicos de otros sistemas de regulación. Por otra parte el hecho de que el efecto del  $Ca^{2+}$  sea producido también por  $Mg^{2+}$  y el que la concentración de éste en el citoplasma sea muy superior ha hecho que la propuesta del  $Mg^{2+}$  como inhibidor sea actualmente la más aceptada por la mayoría de los investigadores (Lillo, 1994; Kaiser y Huber, 2001; MacKintosh y Meek, 2001).

Kaiser y colaboradores fueron los primeros en proponer que la actividad NR de plantas podría estar regulada por un proceso de fosforilación/defosforilación del enzima (Kaiser y Brendle-Benish, 1991; Kaiser y Spill, 1991), mecanismo que había

sido descrito previamente para otras enzimas vegetales (Budde y Chollet, 1988). Esta hipótesis se basaba en que la modulación *in vitro* de la actividad NR de extractos de hojas de espinaca, desalados, tratados con concentraciones fisiológicas de  $Mg^{2+}$  y ATP (para inactivar) o bien de AMP (para activar) presentaba características similares a las de la modulación de la NR *in vivo*, resultados que han sido corroborados con posterioridad en otras especies (Athwal et al 1998a y b; Aguera et al., 1999). Por otra parte en estas experiencias análogos no hidrolizables de ATP no producían la inactivación de la NR, indicando que la inactivación del enzima de hojas de espinaca implicaba la hidrólisis del ATP.

A partir de estos experimentos preliminares este posible mecanismo de fosforilación ha sido objeto de una intensa investigación. En 1992 el grupo de Huber mostró la fosforilación de cuatro péptidos de la NR de hojas de espinaca tras el suministro de  $(^{32}P)Pi$ . Esta aproximación permitió determinar que la NR se marcaba en cualquiera las condiciones ensayadas únicamente en residuos de Ser. Los resultados mostraban que la mayor parte del marcaje se concentraba en tres péptidos, pudiéndose correlacionar estados de activación extremos de la NR con diferencias en el marcaje de dos de ellos. Cuando el enzima se hallaba en un estado de alta actividad producido mediante el suministro a la hoja de manosa en oscuridad, el marcaje de estos péptidos era menor. Por otra parte era posible correlacionar un mayor marcaje de estos péptidos con un estado de baja actividad NR, inducido mediante el suministro de okadaico a las hojas en iluminación. Esta misma técnica se ha utilizando para poner de manifiesto un comportamiento similar en hojas de maíz (Huber et al., 1994b).

A pesar de que las diferencias en el marcaje radiactivo entre estas formas

extremas de actividad NR implicaban dos péptidos, los ensayos de fosforilación in vitro de la NR con quinasas parcialmente purificadas sólo permiten localizar un residuo fosforilado. La localización del residuo de Ser fosforilado se llevó a cabo por primera vez en 1995 utilizando una quinasa parcialmente purificada e identificada por su capacidad para inactivar a la NR en presencia de MgATP. Esta quinasa se ha utilizado para fosforilar in vitro a la NR utilizando Mg[ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, lo que ha permitido determinar que dicha fosforilación se producía en la Ser-543 (Douglas et al., 1995). La localización de esta Ser también se ha llevado a cabo mediante experimentos de mutación dirigida sobre la NR de *Arabidopsis thaliana* expresada en la levadura *Pichia pastoris* en los que se ha sustituido la Ser-534 (equivalente a la Ser-543 de la NR de hojas de espinaca) por un residuo de Asp, eliminando de esta forma la inhibición de la NR dependiente de ATP (Su et al., 1996).

Independientemente MacKintosh mostró que el efecto activador de la luz sobre la actividad NR se bloqueaba tras el suministro in vivo a la hoja de microcistina-LR, ácido okadaico o tautomicina, descritos como potentes inhibidores de fosfatasas de tipo 1 y 2A, indicando que la activación por luz de la NR se produciría por defosforilación del enzima (Mackintosh, 1992). Posteriormente estos resultados fueron corroborados desde otras aproximaciones experimentales (Kaiser y Huber, 1994; Huber y Huber, 1995; Glaab y Kaiser, 1996; Bachman et al., 1996b) y en otras especies vegetales: calabaza (Glaab y Kaiser, 1996) y guisante (Kaiser y Huber, 1994; Glaab y kaiser, 1996).

Desde diferentes aproximaciones, Mackintosh (1992) y Spill y Kaiser (1994) se puso también de manifiesto que la fosforilación de la NR no era suficiente para

producir su inactivación y que en el mecanismo de modulación estaban implicadas otras proteínas. Mediante la purificación parcial de la NR por cromatografía de afinidad en azul-sefarosa, Mackintosh lograba una fracción NR que sólo se inactivaba in vitro con ATP si se añadía otra fracción presente en el extracto eluída de la columna con 0.6 M NaCl. Por otro lado Spill y Kaiser identificaron dos fracciones proteicas necesarias para inactivar in vitro con ATP a la NR. Una de estas fracciones a la que denominaron P<sub>67</sub> presentaba actividad quinasa, indicando la implicación de una proteína quinasa en el proceso de inactivación por oscuridad de la NR, la otra, a la que denominaron P<sub>100</sub>, estaba también implicada en el proceso de modulación pero no tenía actividad fosfatasa ni quinasa. En los extractos de hojas aparecen varias actividades quinasa con capacidad para fosforilar la Ser-543 de la NR o un péptido sintético basado en la secuencia que rodea a esta Ser. En extractos de hojas de espinaca se han separado cromatográficamente tres picos con actividad quinasa a los que se ha designado con el nombre PK<sub>I</sub> PK<sub>II</sub> y PK<sub>III</sub> (McMichael, 1995; Douglas et al, 1997). PK<sub>I</sub> y PK<sub>II</sub> son quinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> y además han resultado ser calmodulina dependientes (Douglas et al., 1998), mientras que PK<sub>III</sub> es calcio independiente y se ha descrito como una proteína perteneciente al grupo de enzimas SNF1 (Sugden et al., 1999). Por tanto hasta la fecha no es posible establecer si alguna de estas actividades quinasas con capacidad de fosforilar a la NR estaría implicada en la regulación del enzima in vivo.

Por otra parte la segunda fracción proteica implicada en el proceso de modulación de la actividad NR, identificada por el grupo de Kaiser, denominada P<sub>100</sub> resultó necesaria para inactivar a la NR, uniéndose al enzima previamente

fosforilado en presencia de  $Mg^{2+}$ . Como la NR se inhibe inmediatamente tras la adición de esta proteína, a la que se denominó NIP, se postuló que actuaba uniéndose a la NR y no mediaba ninguna reacción catalítica (Glaab y Kaiser, 1995; Mackintosh et al., 1995).

Esta proteína inhibidora de la NR se ha identificado como un miembro de la familia de proteínas 14-3-3 (Bachman et al., 1996a; Ferl, 1996; Huber et al., 1996; Moorhead et al., 1996; Sehnke y Ferl, 1996), grupo de proteínas que se encuentran en un amplio rango de sistemas biológicos, desde levaduras a mamíferos, y que parecen funcionar en todos ellos implicados en mecanismos de transducción de señales y fosforilación. La posterior purificación de esta fracción NIP ha puesto de manifiesto que realmente es una mezcla de varias isoformas de 14-3-3. Además recientemente se ha propuesto que estas proteínas estarían implicadas, no sólo en la regulación de la inhibición dependiente de  $Mg^{2+}$  de la NR sino también en el control de la proteólisis del enzima. (Kaiser y Huber, 1997; Weiner y Kaiser, 1999)

En resumen, en el modelo de modulación propuesto, la fosforilación de la NR es condición necesaria pero no suficiente para producir la inhibición del enzima, de forma que la NR fosforilada sigue siendo activa. El sistema requiere la presencia del NIP, que se une a la forma fosforilada del enzima, en presencia de  $Mg^{2+}$ , formando un complejo NR fosforilada- $Mg^{2+}$ -NIP, inactivo. La activación del enzima implicaría la disociación del complejo de forma aún no determinada y posteriormente se produciría la defosforilación del mismo.

A pesar de los progresos realizados en los últimos diez años en el estudio del mecanismo de regulación, de acuerdo con el modelo inicialmente propuesto, la

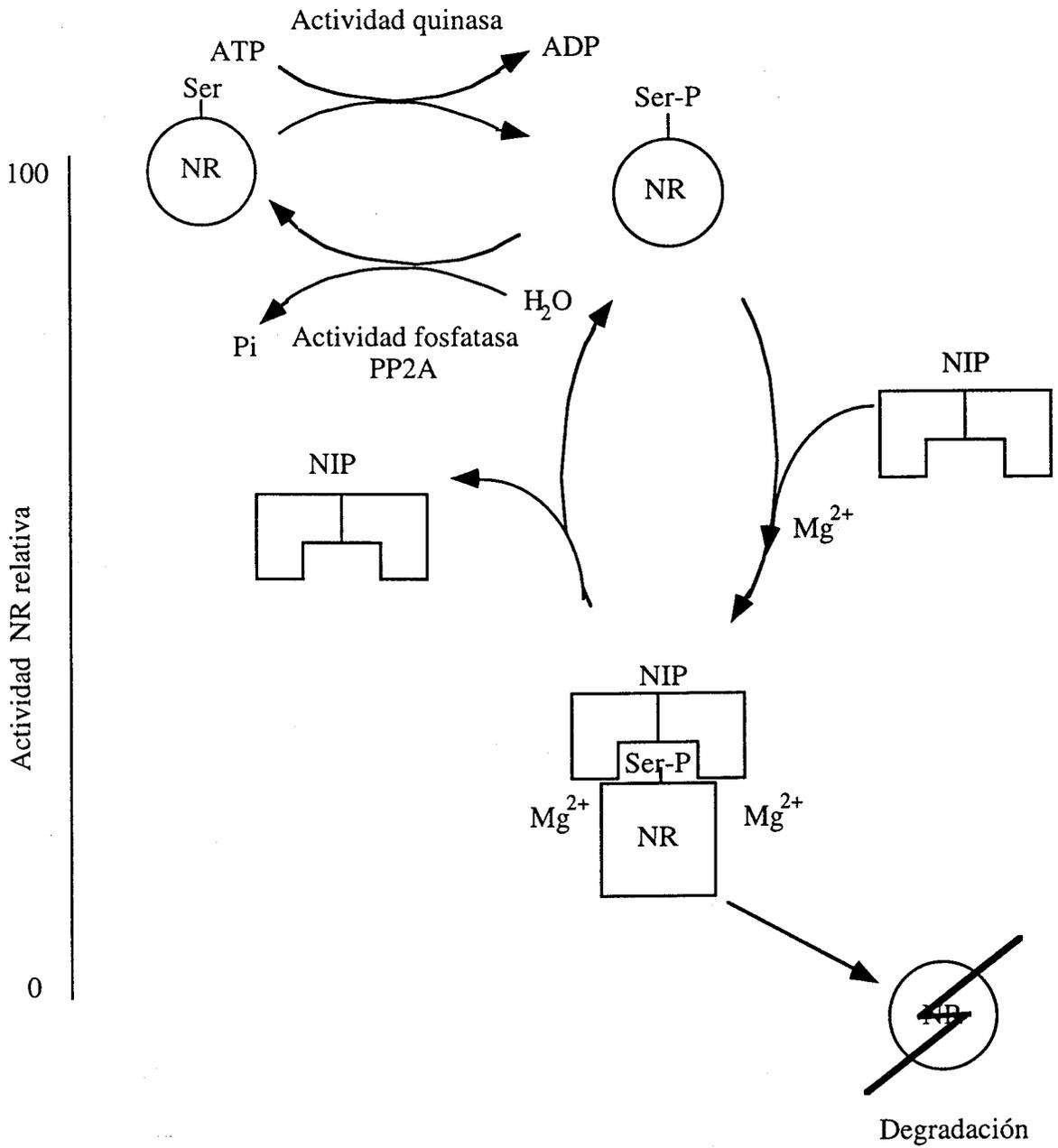
naturaleza de la señal o señales que modulan la activación por luz de la NR así como su dependencia por CO<sub>2</sub> permanecen sin determinar con claridad. En principio, Kaiser propuso que la razón ATP/AMP en el citosol actuaría como señal implicada en la modulación de la NR (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992). Sin embargo posteriormente se puso de manifiesto que la magnitud de la variación en esta razón ATP/AMP en las transiciones luz-oscuridad no era suficiente para determinar cambios en el estado de activación de la NR (Riems y Heldt, 1992). En 1993 Glaab y Kaiser propusieron que los niveles citosólicos de ATP podrían regular la velocidad de reacción de las quinasas de la NR. Sin embargo los valores de K<sub>m</sub> para ATP que presentan estas proteínas están por debajo de 10 μM (Bachman et al 1995), mientras que las concentraciones menores de ATP en el citoplasma se encuentran entre 200 y 400 μM. Además en las transiciones luz-oscuridad los niveles citosólicos de ATP y ADP se mantienen constantes, por ello no parece probable que estos niveles intervengan en la regulación de la NR sometida a transiciones luz-oscuridad. Por otra parte existen evidencias recientes que muestran que el AMP podría interaccionar con las proteínas 14-3-3, impidiendo la inhibición de la NR (Athwal et al., 1998a). También se ha propuesto que cambios en el pH citosólico podrían actuar sobre la actividad NR, aunque finalmente también se ha concluido que los cambios de pH en transiciones luz-oscuridad no serían suficientes para asignarle este papel (Bachman et al., 1995).

Probablemente ninguno de estos cambios, que se producen en condiciones fisiológicas en un ciclo normal día noche, constituyan la señal implicada en la modulación de la actividad NR. En estas condiciones es muy probable que sean los productos de la fijación de CO<sub>2</sub> los que actúen como señal reguladora

(Gerhardt et al., 1987).

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido profundizar en la naturaleza de las señales reguladoras de la actividad NR foliar de cebada. Además se ha analizado el modo de acción de posibles efectores, que en el marco del modelo propuesto permiten plantear una modulación fina de la actividad NR en respuesta a cambios fisiológicos en las condiciones ambientales.

**Esquema 1. Hipótesis del control por fosforilación reversible de la actividad NR de hojas de espinaca.**



La inactivación reversible de la NR de hojas de espinaca precisa de la fosforilación del enzima y su unión al factor proteico inhibidor, en el que el Mg<sup>2+</sup> juega un papel esencial. NIP factor proteico inhibidor de la NR

## ***II. MATERIALES Y MÉTODOS***

## **2.1.MATERIAL BIOLÓGICO**

### **2.1.1. Especie utilizada**

Este trabajo se ha llevado a cabo con hojas de plántulas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) de la variedad "Hassan", obtenidas a partir de semillas producidas y proporcionadas por Senasa (Elorz, España).

En todos los casos se escogieron hojas bien desarrolladas y de aspecto saludable, intentando seleccionar las de características similares en todos los experimentos. Si no se indica lo contrario, todos los ensayos se realizaron con hojas recolectadas a las 2 h del inicio del fotoperiodo. Las plantas de cebada se utilizaron a los 8 días de la siembra (estadio 11 según la codificación BBCH).

Después de cada tratamiento y antes de preparar los extractos crudos, se seleccionó la parte central de la hoja y se determinó rápidamente el peso fresco del tejido en una balanza de precisión.

Para las determinaciones de actividades fotosintéticas, se estimó la superficie foliar mediante pesada en balanza de precisión de fotocopias de los fragmentos de hoja, respecto a las de superficies de referencia.

### **2.1.2. Condiciones de cultivo**

#### **2.1.2.1. Siembra, germinación y crecimiento**

Las plantas se cultivaron en un soporte inerte, vermiculita, previamente lavada en agua destilada. Todas las semillas se sembraron en vasos de plástico de 200 ml, rellenos de vermiculita, colocándolas a una profundidad de 1,5 cm de la superficie.

Las paredes de los vasos se cubrieron con papel de aluminio para evitar el acceso de luz y su base se perforó para permitir el drenaje. A continuación, se situaron en la cámara de cultivo, y a partir de este momento se empezó a contar la edad de las plantas.

La germinación de las semillas y crecimiento de las plantas se realizó en una cámara de cultivo en condiciones controladas, con un fotoperiodo de 12 h luz (RFA de entre 350-400  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  a 25 °C y 60±5% HR) y 12 h de oscuridad (a 20°C y 70±5% HR). La luz se obtuvo con una combinación de luz fluorescente (18 unidades de 36W Sylvania Luxline ES *homelight de luxe*) e incandescente (8 unidades de 40W Osram Superluxe).

Durante el período de luz, la humedad ambiental se mantuvo mediante un pulverizador-atomizador de agua (Defensor AG-Model 505, Suecia) y se registró continuamente con un termohigrómetro (Lambrecht. Göttingen, Alemania). Además, la atmósfera de la cámara se agitó suavemente mediante ventiladores domésticos. Durante la germinación, los cultivos se regaron diariamente con agua destilada, y posteriormente, con las soluciones nutritivas adecuadas, según el tipo de tratamiento.

#### **2.1.2.2. Soluciones nutritivas**

Todas las soluciones nutritivas se prepararon según los métodos generales de Hewitt (1966). Habitualmente, se utilizó una solución nutritiva con nitrato como única fuente de nitrógeno, con un pH de 6,5±0,5, que contenía:

### 1.- Macronutrientes:

KNO <sub>3</sub>	5,00 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5,00 mM,
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	2,00 mM,
NaPO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1,33 mM

### 2.- Micronutrientes:

NaCl	0,1 mM.
BO <sub>3</sub> H <sub>3</sub>	50,0 μM
Fe (como sequestrene 138 Fe)*	0,1 matg/l
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10,0 μM
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	10,0 μM
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1,0 μM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,5 μM
CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,2 μM

\*El Fe Sequestrene aporta un 6% de hierro quelado, soluble en agua, en forma de sal férrica del ácido diamino di (*o*-hidroxifenil) diacético.

Para los ensayos descritos en el Apartado 3.1.3 (Resultados) se utilizaron plantas de cebada cultivadas con medios de distinta composición en cuanto a la fuente de nitrógeno. En estos casos se utilizaron soluciones Long Ashton tipo nitrato o amonio (Hewitt, 1966), con la misma composición en micronutrientes descrita anteriormente, y modificando la de macronutrientes para que contuvieran distintas concentraciones de nitrato y/o amonio, como se detalla en la *Tab. 1*.

*Tab. 1. Composición en macronutrientes de las soluciones nutritivas utilizadas en los ensayos descritos en la sección 3.1.3 (Resultados)*

Macronutriente	Fuente de nitrógeno				
	Nitrato	8,7	3,0	1,5	0,7
	Amonio	-----	8,0	8,0	8,0
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>		2,9	1,5	0,75	0,35
KNO <sub>3</sub>		2,9	-----	-----	-----
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		-----	4	4	4
MgSO <sub>4</sub>		1,5	1,5	1,5	1,5
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H		1,3	1,3	1,3	1,3
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		1,2	2,0	2,0	2,0
CaCl <sub>2</sub>		1,2	2,5	3,2	3,6

Concentraciones en mM

El pH de los distintos medios fue de  $6,5 \pm 0,5$ .

## 2.2. SUMINISTRO DE SOLUTOS A LA HOJA POR LA CORRIENTE DE TRANSPIRACIÓN

Para suministrar solutos a las hojas, éstas se cortaron por su base, y tras sumergirlas en agua se les dio un nuevo corte para evitar la obstrucción de los vasos por burbujas de aire. Posteriormente, las hojas, con su base sumergida en agua o en las distintas soluciones de ensayo, se transfirieron a una cámara de transpiración (Li-Cor 6200-13, de 250 ml de volumen total, Li-Cor Inc., EEUU.) similar a la utilizada en el sistema de espectroscopía de gases por infrarrojos (IRGA). La cámara, de metacrilato transparente, está provista de entrada y salida de gases, sensor de humedad y temperatura y un ventilador que homogeniza la fase gaseosa y hace mínima al capa estacionaria. La cámara se gaseaba con aire a 25 °C y 47 % de HR y un flujo de 100 ml · min<sup>-1</sup> por cada 2 hojas introducidas en la cámara. Estos parámetros se determinaron a la salida de la cámara mediante un flujómetro (Platon, Phlowbits Ltd., R.U.) y un sensor de humedad y temperatura (Vaisala OY, Helsinki, Finlandia).

La luz (350  $\mu$ mol fotones · m<sup>-2</sup> · s<sup>-1</sup>), perpendicular a la superficie de la hoja, se proporcionó con un proyector de diapositivas (Reflecta-Diamator, Alemania) provisto de una lámpara halógena de tungsteno (Philips, 100 W-24 V, Alemania) y un filtro de calor (Balzers, Alemania). La luz incidente se determinó utilizando un fotómetro-radiómetro integrador LI-COR con sensor de fotones LI-190 SB (Li-Cor Inc., EEUU).

Tras introducir las hojas en la cámara y cerrar ésta, se equilibró en las condiciones de flujo gaseoso iniciales y se indujo la transpiración al iluminar,

monitorizándose ésta por el aumento de HR del aire de salida. El tratamiento se mantuvo normalmente durante 30 min, y se consideró adecuado cuando la diferencia de presión de vapor de agua del aire de entrada y de salida de la cámara fue aproximadamente de 0,9 kPa.

## **2.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NR EN EXTRACTOS DE HOJAS**

El enzima **nitrato reductasa** (NADH:NR, NADH:nitrato oxidorreductasa, E.C. 1.6.6.1), cataliza la reacción:



La actividad NR se determinó cuantificando espectrofotométricamente el nitrito formado en la reducción de nitrato dependiente de NADH. El método usado (Snell and Snell, 1949) se basa en la interacción del nitrito con la sulfanilamida, para formar, en medio ácido, una sal de diazonio. Posteriormente, ésta da lugar a un complejo coloreado estable al reaccionar con la NNEDA. Este complejo, de color rosa, tiene un máximo de absorción en el visible a 540 nm.

### **2.3.1. Preparación de extractos crudos y desalados de hojas**

Las hojas, recién cortadas de la planta o tras los tratamientos indicados en cada caso, se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido, con objeto de detener el metabolismo foliar y así obtener el enzima en un estado lo más próximo posible al que existe in vivo. Las hojas congeladas (100 mg) se pulverizaron en un mortero de porcelana, enfriado con N<sub>2</sub> líquido. Al mortero se añadieron 2 ml de medio de extracción a 4 °C y 0,2 g de PVP insoluble, previamente lavada con agua destilada y equilibrada con el tampón de extracción, quedando una relación PF/volumen de extracción de 1:20. El extracto obtenido se clarificó por centrifugación (1 min a 15.000 x g) en una Microfuge ETM (Beckman, Alemania). El sobrenadante (extracto crudo) se utilizó, bien directamente o tras desalado, en los ensayos de

actividad NR.

Para el desalado de los extractos crudos se utilizaron columnas de Sephadex G-25 M (PD-10 de Pharmacia, Uppsala, Suecia). Las columnas se equilibraron previamente con 25 ml del medio de extracción utilizado en cada caso, pero sin BSA ni leupeptina. A la columna se aplicaron volúmenes de hasta 2 ml de extracto crudo, eluyendo con el medio de extracción (sin BSA ni leupeptina) a un flujo de  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Todo el proceso se realizó entre 0 y 4 °C, con una duración de 2-3 min. El factor de dilución de la muestra (calculado determinando proteínas antes y después del desalado) era de alrededor de 1,4 con rendimientos superiores al 95%.

Se han utilizado dos tipos de medios de extracción que denominamos base y estándar, con la siguiente composición:

**1.- Medio Base:**

Tampón Hepes-KOH, pH 7,6	50 mM
Leupeptina	50 $\mu\text{M}$
BSA (neutralizada a pH 7,6 con KOH)	0,5 % (p/v)

**2.- Medio Estándar:**

Tampón Hepes-KOH, pH 7,6	50 mM
Leupeptina	50 $\mu\text{M}$
BSA (neutralizada a pH 7,6 con KOH)	0,5 %
$\text{KPO}_4\text{H}_2\text{-K}_2\text{PO}_4\text{H}$ , pH 7,6 ( $\text{P}_i$ )	5 mM
$\text{Na}_2\text{EDTA}$ (neutralizada a pH 7,6 con KOH)	5 mM

### 2.3.2 Ensayo de actividad NR

Para ensayar la actividad NR se utilizaron alícuotas de los extractos crudos o desalados, mezclados con alícuotas de volumen similar del medio de ensayo preincubado a 25 °C. En cada caso, el medio de ensayo era igual al de extracción (base o estándar), pero sin BSA ni leupeptina, y conteniendo  $\text{KNO}_3$  a una concentración final de 2mM.

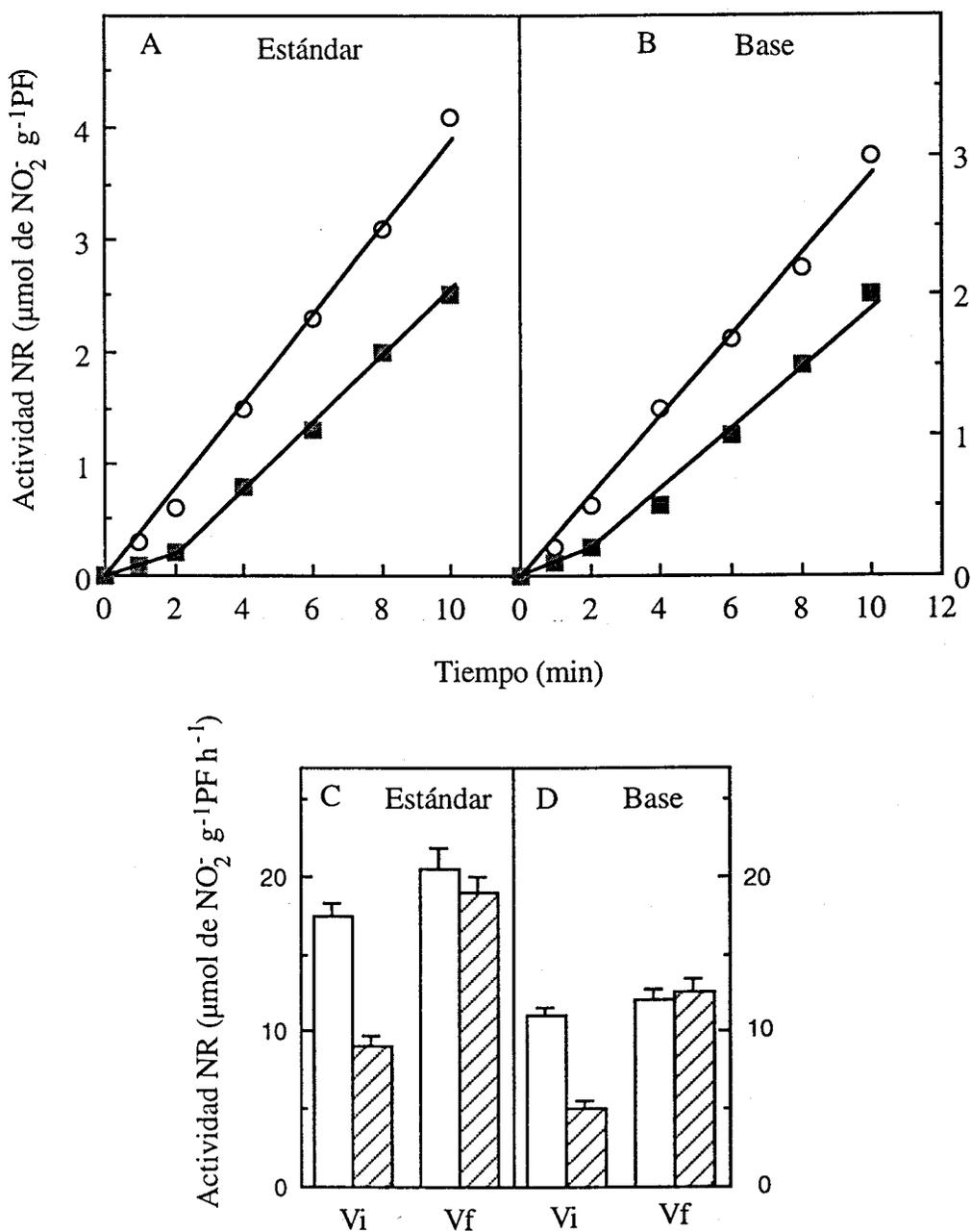
Los ensayos se realizaron a 25 °C con agitación continua. Tras tomar una alícuota como blanco (tiempo cero), la reacción se inició con la adición de NADH para una concentración final de 0,4 mM. Hasta 10 min, se tomaron periódicamente alícuotas de 0,3 ml, que se añadieron a 0,1 ml de acetato de zinc 500 mM para detener la reacción enzimática. Tras añadir 0,05 ml de PMS 200  $\mu\text{M}$ , se incubó 10 min a temperatura ambiente para oxidar el NADH restante. A continuación, se añadieron 0,15 ml de sulfanilamida al 1% (p/v) en HCl 3 N y 0,15 ml de NNEDA al 0,02% (p/v), quedando un volumen final de 0,75 ml. Tras otros 10 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron (10 min, 15.000 x g) en una centrífuga 202-M Sigma, Alemania.

El nitrito producido se determinó cuantificando la absorbancia a 540 nm del sobrenadante en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 (Hitachi Ltd., Tokio, Japón). La relación entre absorbancia y concentración de nitrito, se estableció mediante curvas patrón de  $\text{KNO}_2$  en cada experimento. Tras considerar los distintos factores de dilución de la muestra, se refirió la actividad NR al peso fresco de la hoja utilizada.

En la *Fig. 1*, se muestra una típica cinética de reducción de nitrato

dependiente de NADH por extractos crudos obtenidos y ensayados en medio estándar (*Fig. 1-A*) y medio base (*Fig. 1-B*) de hojas de cebada sometidas a una transición luz–oscuridad. En medio estándar, se observa claramente que en los extractos procedentes de hojas en luz la actividad NR era prácticamente lineal durante el tiempo de ensayo ( $20 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Cuando las hojas se sometieron a un corto período de oscuridad, aparecía un lag en los primeros minutos de ensayo, donde se podía determinar una actividad NR un 55% menor a la determinada en luz en los primeros 2 min. de ensayo. No obstante, la actividad NR se recuperaba de forma gradual hasta alcanzar, en los 6 a 10 min finales del ensayo, valores similares a los de los extractos de hojas en luz (*Fig. 1-A*). Se obtuvieron resultados similares cuando los extractos se obtuvieron y ensayaron con medio base (*Fig. 1-B*). En este caso, las actividades fueron menores, calculándose actividades de 15 y  $7 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$  en luz y oscuridad, respectivamente. Este comportamiento es indicativo de que la NR se inactiva in vivo por oscuridad pero se reactiva in vitro en las condiciones de ensayo. Cuando las plantas se sometieron a condiciones de inhibición de la fijación de  $\text{CO}_2$  in vivo se obtuvieron resultados similares. Por tanto, los cambios rápidos de actividad NR inicial que se observan en los primeros 2 min de ensayo, reflejan cambios en el estado de activación in vivo del enzima, y no son consecuencias de cambios en la cantidad total de NR en la hoja, puesto que las determinaciones realizadas durante los minutos 6 a 10 de la reacción, similares en cualquier extracto ensayado, son un índice de la actividad total presente en el extracto. Esta distinción ha resultado también útil en el estudio de los cambios de actividad de otros enzimas fotomodulados, como la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (Seeman et al., 1985).

**Fig 1.** *Cinética de actividad NR de hojas de cebada en luz o en oscuridad en medio base o estándar.*



Tras dos horas de luz en condiciones de cultivo (○ □) las plantas se mantuvieron en oscuridad durante 30 min (■ ▨). Tras el tratamiento las hojas se congelaron rápidamente en  $\text{N}_2$  líquido. Después de la extracción en medio estándar (A, C) o medio base (B, D) se determinó la actividad NR en el mismo medio de ensayo. A y B, datos de un experimento representativo, C y D media  $\pm$ SE de Vi (0-2 min de ensayo) y Vf (6-10 min de ensayo) de al menos tres experimentos independientes.

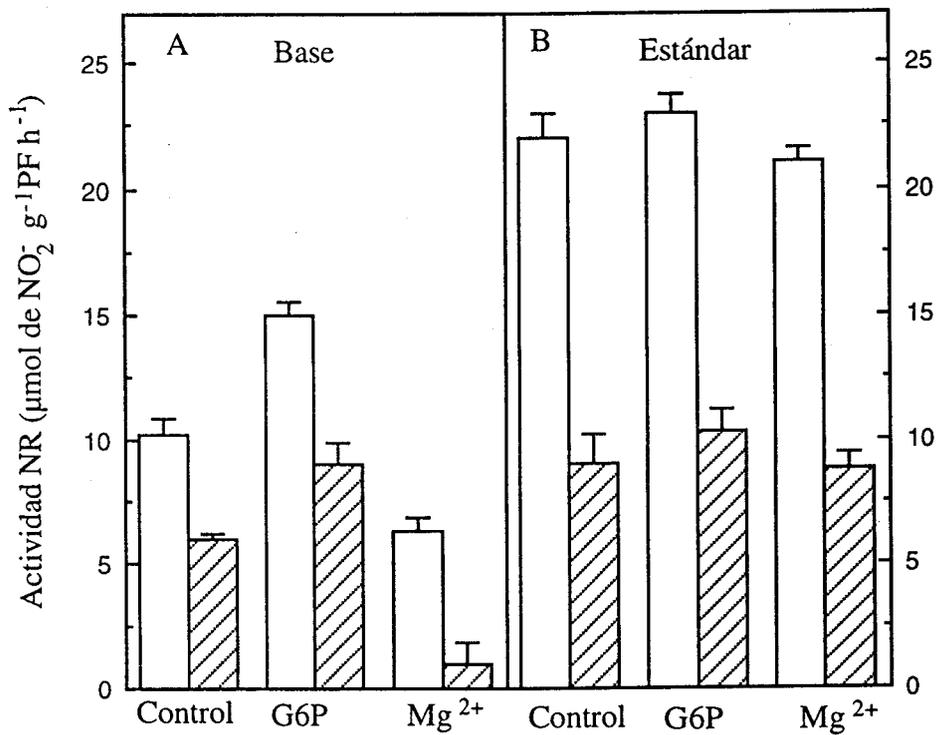
En este trabajo se presenta, a menos que se indique de otro modo, las actividades NR correspondientes a los valores de actividad inicial del enzima ( $V_i$ ), determinados en los 2 primeros minutos del ensayo. No obstante, en todos los casos también se determinó la actividad NR final, determinada en los minutos 6 a 10, como control de que la cantidad total de enzima no cambió en ningún caso.

Si bien, con los dos medios de extracción y ensayo descritos se podían detectar diferencias significativas en el estado de activación de la NR foliar de cebada, la utilización del medio base era estrictamente necesario para llevar a cabo los estudios sobre la modulación in vitro por diferentes azúcares-fosfato y  $Mg^{2+}$  de este enzima. Como se observa en la *Fig. 2-A*, la adición de G6P al medio base produjo una activación in vitro del enzima. Igualmente, la adición de  $Mg^{2+}$ , produjo una inhibición in vitro de la NR. Por el contrario, la adición de G6P o  $Mg^{2+}$  al medio estándar, no produjo efecto significativo in vitro sobre el enzima (*Fig 2-B*).

En los casos donde se expresó la actividad NR como porcentaje de inactivación por oscuridad o de inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  (efector), se utilizó la siguiente expresión:

$$\%I = \frac{V_{(\text{control})} - V_{(\text{oscuridad o } Mg^{2+})}}{V_{(\text{control})}} \times 100$$

**Fig 2.** *Sensibilidad de la NR de hojas en luz o en oscuridad, a la G6P o el Mg<sup>2+</sup>, en medio base o estándar.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo (□), y en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad (▨). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (A) o en medio estándar (B) (M. y M. apartado 2,3). La actividad NR se determinó en el mismo medio en ausencia de efectores (control), en presencia de G6P, 15 mM o de Mg<sup>2+</sup>, 5 mM. Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos diferentes.

donde:

$V_{(\text{control})}$  = actividad NR en extractos de hojas en luz o en ausencia de efector.

$V_{(\text{oscuridad o efector})}$  = actividad NR en extractos de hojas en oscuridad o en presencia de efector.

En los casos en los que se expresó la actividad NR como porcentaje de activación, se utilizó la siguiente expresión:

$$\%A = \frac{V_{(\text{efector})} - V_{(\text{control})}}{V_{(\text{control})}} \times 100$$

donde:

$V_{(\text{control})}$  = actividad NR en extractos de hojas en ausencia de efector.

$V_{(\text{efector})}$  = actividad NR en extractos de hojas tratadas en presencia del efector.

En los casos en los que se presenta la relación entre la eficiencia catalítica de la NR en diferentes situaciones se ha calculado como sigue:

$$\left( \frac{V_{\text{max}}^t}{K_m^t} \right) \Bigg/ \left( \frac{V_{\text{max}}^c}{K_m^c} \right)$$

Donde:

$V_{\text{max}}^t$  = La  $V_{\text{max}}$  de la NR en extractos de hojas tratadas en presencia del efector

$K_m^t$  = La  $K_m$  para nitrato de la NR en extractos de hojas tratadas en presencia del efector

$V_{\max}^c = La V_{\max}$  de la NR en extractos de hojas en ausencia de efector.

$K_m^c = La K_m$  para nitrato de la NR en extractos de hojas en ausencia de efector.

Aunque no se presenta un cálculo preciso de la eficiencia catalítica, puesto que no se ha estimado la concentración de enzima total en los extractos (necesaria para calcular la  $K_{cat}$ ), se ha obtenido la relación entre las eficiencias catalíticas tras simplificar la expresión general, basándose en el hecho de que la concentración de NR total ( $E_t$ ) en los extractos que se comparan es la misma (de Cires et al., 1993a). A continuación se presenta el desarrollo:

$$1) E_{cat}^t / E_{cat}^c$$

$$2) \left( \frac{K_{cat}^t}{K_m^t} \right) / \left( \frac{K_{cat}^c}{K_m^c} \right)$$

$$3) \left( \frac{V_{\max}^t}{K_m^t \cdot E_t} \right) / \left( \frac{V_{\max}^c}{K_m^c \cdot E_t} \right)$$

Reordenando

$$4) \frac{V_{\max}^t \cdot K_m^c \cdot E_t^c}{K_m^t \cdot E_t^t \cdot V_{\max}^c}$$

Aplicando ahora la restricción  $E_i^t = E_i^c$  y reordenando la expresión queda :

$$5) \left( \frac{V_{\max}^t}{K_m^t} \right) \Big/ \left( \frac{V_{\max}^c}{K_m^c} \right)$$

Donde:

$E_{\text{cat}}^t, E_{\text{cat}}^c$  = La eficiencia catalítica de la NR en extractos de hojas en presencia y en ausencia de efector respectivamente.

$K_{\text{cat}}^t, K_{\text{cat}}^c$  = La constante de catálisis de la NR en extractos de hojas en presencia y en ausencia de efector respectivamente.

$V_{\max}^t, V_{\max}^c$  = La velocidad máxima de la NR en extractos de hojas en presencia y en ausencia de efector respectivamente.

$K_m^t, K_m^c$  = La  $K_m$  para nitrato de la NR en extractos de hojas en presencia y en ausencia de efector respectivamente.

$E_i^t, E_i^c$  = La cantidad de NR total en extractos de hojas en presencia y en ausencia de efector respectivamente.

### **2.3.3 Cálculo de las concentraciones de efectores libres en el ensayo de actividad NR**

En el apartado 3.2.3 de resultados la actividad NR de hojas de cebada se determinó en presencia de glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato y dihidroxiacetona fosfato en el medio de ensayo. Estos efectores poseen una determinada capacidad

para formar complejos con iones metálicos (e.g.  $Mg^{2+}$ ), disminuyendo la concentración efectiva tanto del ion como del propio efector en el medio de ensayo. Resultaba pues necesario determinar, en nuestras condiciones de ensayo, las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y efector libres, a partir de las constantes de estabilidad de los complejos [Mg-azúcar-fosfato], para determinadas concentraciones totales de cada especie.

La constante de estabilidad (K) de un complejo que define el equilibrio entre un ión metálico y un ligando viene definida por la expresión:

$$K = \frac{[M-L]}{[M]_L \times [L]_L} = \frac{[M-L]}{[M]_L \times [L]_T - [M]_L \times [M-L]}$$

donde:

[M-L] = concentración del complejo ligando-ion metálico

[M]<sub>L</sub> = concentración de ion metálico libre

[L]<sub>L</sub> = concentración de ligando libre

[L]<sub>T</sub> = concentración total de ligando

Las constantes de estabilidad aparentes ( $K_{ap}$ ) utilizadas (*Tab. 2*), se han tomado de la literatura y normalizado a pH 7,6 (pH del medio de ensayo de la actividad NR), mediante la expresión (O' Sullivan y Smither, 1979):

$$K_{(pHa)} = K_{(pH7,6)} \times \frac{1 + 10^{pKa - 7,6}}{1 + 10^{pKa - pHa}}$$

donde:

pHa = valor de pH en el que se calcularon las  $K_{ap}$  en la literatura

pKa = valor de pKa que afecta a la concentración de la especie con actividad quelante

Para el cálculo de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  y efector libres, se utilizó un programa informático (Rodríguez-Sotes y Muñoz-Clares, 1990), basado en el algoritmo descrito por Storer y Cornish-Bowden (1976). En estos cálculos se ha tenido en cuenta que, del resto de componentes del medio de ensayo de actividad NR, el NADH tiene también capacidad quelante (Duggleby y Dennis, 1970), y se ha descontado su contribución en el establecimiento de la concentración final de  $Mg^{2+}$  libre.

**Tab. 2**      *Constantes de estabilidad utilizadas en el cálculo de las concentraciones de efectores libres*

Complejo	$K_{(ap)} (M^{-1})$	Referencia
Mg-glucosa 6-fosfato	64	O ' Sullivan y Smither, 1979
Mg-PO <sub>4</sub> H	414	O ' Sullivan y Smither, 1979
[Mg-ATP] <sup>2</sup>	65 x 10 <sup>3</sup>	O ' Sullivan y Smither, 1979
[Mg-EDTA] <sup>2</sup>	10 <sup>6</sup>	Dawson et al., 1969
Mg-NADH	100	Duggleby y Dennis, (1970)

Los valores de constantes de estabilidad aparente están calculados para un pH 7,6

**Tabla 3** *Concentraciones de efectores utilizados para obtener las condiciones de ensayo de la Fig. 19 (apartado 3.2.3 de resultados)*

<b>Ensayo</b>	<b>Mg<sup>2+</sup><sub>total</sub> (mM)</b>	<b>EDTA (mM)</b>	<b>G6P (mM)</b>
0 mM Mg <sup>2+</sup>	5	6	–
0 mM Mg <sup>2+</sup> + G6P	5	6	10
2 mM Mg <sup>2+</sup>	5	3	–
2 mM Mg <sup>2+</sup> + G6P	5	1,6	11,5
3,2 mM Mg <sup>2+</sup>	5	1,7	–
3,2 mM Mg <sup>2+</sup> + G6P	6	0,6	12
4,8 mM Mg <sup>2+</sup>	5	–	–
4,8 mM Mg <sup>2+</sup> + G6P	8	–	13

## **2.4.- FRACCIONADO CON SULFATO AMÓNICO DE EXTRACTOS CRUDOS DE HOJAS DE CEBADA.**

Con objeto de obtener a partir de extractos de hojas en luz o en oscuridad preparaciones de NR libre de otros componentes del mecanismo de regulación de la actividad enzimática, se procedió a fraccionar los extractos por precipitación con sulfato amónico. Todo el proceso se llevó a cabo entre 0 y 4 °C y en el mínimo tiempo posible. Las fracciones precipitadas se resuspendieron en 2 ml de medio base sin BSA y una vez desaladas en columnas de Sephadex G25 (PD-10 de Pharmacia, Uppsala, Suecia) se les determinó proteína y se utilizaron en los ensayos de actividad en las condiciones indicadas en cada caso.

### **2.4.1.- Obtención del extracto crudo**

Para cada preparación se partió de 10 g de hojas de cebada iluminadas en las condiciones de cultivo durante 2 horas o después de sometidas a 60 min de oscuridad. Las hojas se pulverizaron en N<sub>2</sub> líquido y se extrajeron en 30 ml de medio de extracción base sin BSA con 5 g de PVP insoluble y Tritón X-100 al 0,1%.

El extracto se filtró a través de 4 capas de gasa de nylon (80µm de diámetro de poro) y se clarificó por centrifugación a 45.000 x g durante 10 min. Una alícuota de 2 ml del sobrenadante se desaló inmediatamente y el eluido se utilizó para determinar proteína y ensayar actividad NR. A esta fracción se denominó “*extracto crudo desalado*” (ECd)

#### **2.4.2.- Fraccionamiento del extracto crudo con sulfato amónico**

Al extracto crudo se añadió gradualmente sulfato amónico pulverizado, hasta el 30% de saturación. La solución se mantuvo en agitación durante 10 min y después se centrifugó a 45.000 x g 10 min. Tras decantar el sobrenadante el precipitado se resuspendió en 2 ml de medio base sin BSA y esta alícuota una vez desalada fue la fracción llamada "*fracción 0-30*" ( $f_{0-30}$ ). Se determinó su contenido en proteína y se utilizó en los ensayos de actividad NR.

El sobrenadante de la fracción anterior se llevó hasta el 70% de saturación con sulfato amónico siguiendo el mismo procedimiento. La fracción obtenida una vez desalada se denominó "*fracción 30-70*" ( $f_{30-70}$ ), en ella se determinó proteína y actividad NR.

## **2.5. OBTENCIÓN DE FRACCIONES PARCIALMENTE PURIFICADAS DE NR DE HOJAS DE CEBADA POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.**

Con el mismo objetivo que se menciona en el apartado anterior se procedió a obtener fracciones parcialmente purificadas de NR por cromatografía de afinidad en azul-sefarosa de extractos crudos de hojas en luz y en oscuridad. La azul-sefarosa utilizada (Blue Sepharose 6 Fast Flow, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia) está formada por una matriz de agarosa asociada a un colorante, el azul de cibacron, que tiene afinidad por ciertas enzimas cuyos cofactores son pirindín nucleótidos [ATP, NAD(P)H, etc]. Todo el proceso se llevó a cabo entre 0 y 4 °C y en el menor tiempo posible.

### **2.5.1.- Obtención del extracto crudo**

En la obtención del extracto crudo se utilizó el protocolo descrito en la sección 2.4.1 de M. y M.

### **2.5.2.- Cromatografía de afinidad en azul-sefarosa**

El extracto crudo se mezcló con 3 ml de azul-sefarosa previamente equilibrada con tampón Hepes-KOH 50 mM, pH 7,6 y la mezcla se mantuvo en agitación durante 20 min para permitir la adsorción de la proteína a la matriz. A continuación se vertió en una columna ( $\varnothing$ 1cm x 9 cm) y se dejó sedimentar drenando a un flujo de 1ml/min, recogiendo el eluido al que una vez desalado se denominó "*fracción no fijada, desalada*" (NFd). Alícuotas de esta fracción se utilizaron en los ensayos de actividad NR y para determinar proteína .

La columna de azul-sefarosa se lavó a continuación al mismo flujo con 100

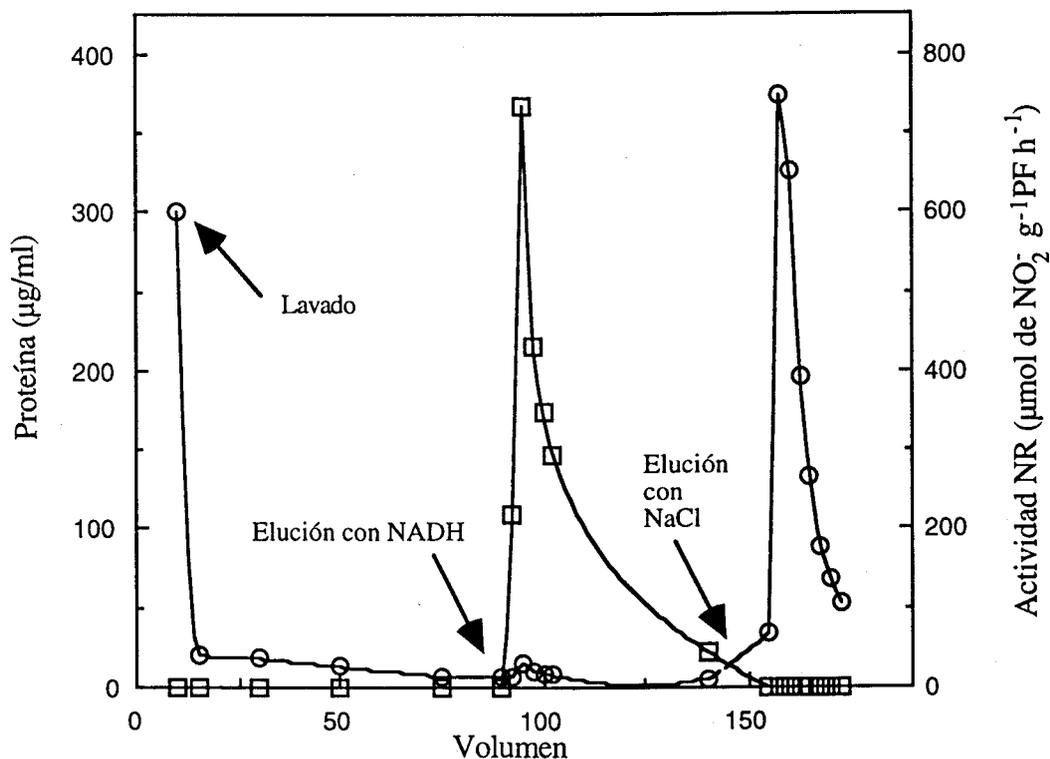
ml del tampón de equilibrado, volumen suficiente para obtener una  $A_{280}$  estable y próxima a 0. Alícuotas de esta fracción denominada *lavado (L)* se desalaron y utilizaron para determinar proteína y actividad NR.

La fracción parcialmente purificada de NR se obtuvo por elución de la columna con un tampón Hepes-KOH 50 mM pH 7,6, conteniendo NADH  $100\mu\text{M}$ , al mismo flujo. El perfil de elución se muestra en la *Fig. 3*. Tras descartar los primeros 2,5 ml, las fracciones de máxima actividad se reunieron en un volumen final de 7,5 ml. Esta fracción se denominó "*nitrito reductasa parcialmente purificada*" (*NRp*). La preparación obtenida se conservó a  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  no más de 1 h, período de tiempo en el que no se producía pérdida de actividad, y durante el cual se realizaron los ensayos indicados en cada caso.

La columna de azul-sefarosa se continuó lavando con la solución de elución de NR antes mencionada, al mismo flujo y hasta un volumen total de 50 ml. Esta fracción se denominó "*resto elución NADH*" (*reNADH*) y en ella se determinó proteína y actividad NR.

El resto de proteínas retenidas en la columna se eluyeron con 50 ml de tampón de equilibrado conteniendo 0,6 M NaCl. Descartados los 2,5 primeros ml de elución, las fracciones con el máximo contenido proteico se reunieron en un volumen final de 7,5 ml. Esta fracción previamente desalada se denominó "*fracción NaCl, desalada*" (*NaCl<sub>d</sub>*). Los otros 40 ml de eluido con NaCl constituyeron la "*fracción resto NaCl*" (*reNaCl*), una alícuota de esta fracción se desaló y se utilizó para determinar proteína y actividad NR.

**Fig. 3** Patrón de elución de proteína y actividad NR de la columna de azul-sefarosa



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Los extractos se prepararon como se indica en M. y M. apartado 2.4. Se muestran los valores de cantidad de proteína (O) y actividad NR (□) de un experimento representativo.

En estas condiciones únicamente la fracción *NRp* presentaba actividad NR. En todos los casos la purificación fue de unas 70 veces obteniéndose una actividad específica de aproximadamente 700 mU/mg prot lo que supuso un rendimiento aproximado de un 12%. En cuanto a contenido proteico la recuperación después de todo el proceso fue en todos los casos de entre un 89 y un 97%.

## **2.6. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDADES FOTOSINTÉTICAS EN HOJAS DE CEBADA**

### **2.6.1. Análisis del intercambio de CO<sub>2</sub> y agua por espectroscopía de infrarrojo en fase gaseosa (IRGA)**

La fijación de CO<sub>2</sub> se determinó como intercambio neto de CO<sub>2</sub> en circuito cerrado, utilizando un analizador de gases por infrarrojos (IRGA) modelo LI-6200 provisto de una cámara para hojas tipo 6000-13 (LI-COR Inc., EEUU.).

El equipo está formado por el analizador de CO<sub>2</sub> y la cámara foliar conectados mediante un circuito cerrado, por el que circula la fase gaseosa a un flujo determinado, y una unidad de control programada para realizar todas las funciones de medida y cálculo de parámetros fotosintéticos, a partir de los datos que le suministra el operador y los sensores del aparato, de acuerdo con el desarrollo teórico de von Caemmerer y Farquhar (1981). El analizador es un IRGA diferencial que basa la medida de CO<sub>2</sub> en la diferencia de absorción a 4,26  $\mu\text{m}$  entre una célula de referencia (constantemente exenta de CO<sub>2</sub>) y otra de medida (a la que llega el gas problema). La cámara foliar dispone de un ventilador, que hace mínima la capa estacionaria, y de sensores de humedad relativa, flujo cuántico, temperatura del aire y de la hoja. La unidad de control calcula a partir de todos los datos de medida y en intervalos de tiempo dados (normalmente 10 y 20 s) los siguientes parámetros: velocidad de fotosíntesis neta, flujo de transpiración, conductancias foliar y estomática a la difusión de vapor de agua y de CO<sub>2</sub>, y concentración de CO<sub>2</sub> en el mesófilo (C<sub>i</sub>).

Las hojas de cebada cortadas, con su base sumergida en agua o en la solución indicada en cada caso, se transferían a la cámara del IRGA. Antes de iniciar la medida, el sistema se equilibraba en la fase gaseosa requerida (aire con 400 o 1000 ppm de CO<sub>2</sub>; N<sub>2</sub> con 400 o 1000 ppm de CO<sub>2</sub>), previamente humidificada. El intercambio de CO<sub>2</sub> se determinaba durante 20 min a 24±0,5 °C y una HR de 55±5%, en oscuridad o a diferentes intensidades de luz. La luz, perpendicular a la superficie de la hoja, se proporcionaba con un proyector de diapositivas (Reflecta-Diamator, Alemania) provisto de una lámpara halógena de tungsteno (Philips, 100 W-24 V, Alemania) y un filtro de calor (Balzers, Alemania). Las distintas intensidades de luz se obtuvieron cubriendo la cámara con diversas capas de una gasa de tul y/o variando la distancia de la fuente de luz. La luz incidente se determinó con un fotómetro-radiómetro integrador LI-COR con sensor de fotones LI-190 SB (LI-COR Inc., EEUU.).

Antes de cada serie de medidas, el IRGA se calibraba en un rango de concentraciones de CO<sub>2</sub> entre 0 y 1000 ppm. La velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> considerada, referida a unidad de superficie foliar, fue la media de las velocidades obtenidas entre los 5 y 15 min de la medida.

### **2.6.2. Análisis polarográfico del intercambio de O<sub>2</sub>**

El intercambio de O<sub>2</sub> en hojas de cebada se determinó polarográficamente con un electrodo de O<sub>2</sub> (Pt/Ag-AgCl) para fase gaseosa (Delieu y Walker, 1983; Walker, 1988) en cámara foliar (LD2 Hansatech, R.U.). El sistema permite determinar la fotosíntesis neta como desprendimiento de O<sub>2</sub> por unidad de tiempo y superficie foliar ( $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )

Las medidas se realizaron a 25° C en una atmósfera cerrada saturada de CO<sub>2</sub> (5%; proporcionado por un tampón NaHCO<sub>3</sub>/Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, pH 9, con el que se humedecía un fieltro dispuesto en la cámara foliar). La luz, perpendicular a la superficie de la hoja, se suministró con una fuente de luz LS2 (Hansatech, R.U.), modificando su intensidad con filtros neutros (Balzer, Alemania). La luz incidente se determinó con un fotómetro-radiómetro integrador LI-COR con un sensor de fotones LI-190 SB (LI-COR Inc., EEUU.).

Antes de cada medida, el sistema se calibraba con la cámara preparada, incluida la hoja. A la cámara cerrada se añadía un volumen conocido de aire (normalmente 0,5 ml) mediante una jeringa graduada. Teniendo en cuenta la temperatura a la que se realizaba el experimento, y mediante un simple cálculo, es posible establecer la correspondencia entre concentración de O<sub>2</sub> en  $\mu$ moles y la señal en mV proporcionada por el electrodo y registrada gráficamente.

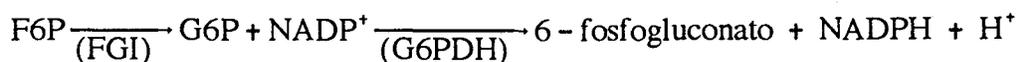
## 2.7. Determinación de los niveles de azúcares-fosfato

### 2.7.1. Obtención de los extractos

Tras los tratamientos indicados en cada caso, las hojas (100 mg) se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido y se homogeneizaron en un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino. Al mortero se añadió 1,5 ml de HClO<sub>4</sub> 0,4 M a 4 °C, quedando una relación PF/volumen de extracción de 1:15. El extracto obtenido se clarificó por centrifugación en una Microfuge ETM (Beckman, Alemania). El sobrenadante se neutralizó con la adición de 0,05 ml de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 5 M. A continuación, se clarificó de nuevo, añadiendo 0,02 g de carbón activo y posterior centrifugación (10 min a 15.000 x g). El sobrenadante se congeló en N<sub>2</sub> líquido hasta ser utilizada en la determinación de azúcares-fosfato.

### 2.7.2. Determinación de hexosas-fosfato

En el sobrenadante antes obtenido, se determinó la cantidad de G6P más F6P (hexosas 6-fosfato, H6P) mediante el ensayo acoplado de la G6P deshidrogenasa (G6PDH)/fosfoglucona isomerasa (FGI), según la reacción (Leegood y Furbank, 1986):



Para esta determinación, 0,5 ml de extracto se añadieron a 0,48 ml de medio de ensayo (Tris-HCl 1 M, pH 7,5, conteniendo NADP<sup>+</sup>, 5 mM). Tras agitar la

muestra y anotar la absorbancia a 340 nm a tiempo cero, se añadieron 0.02 ml de la mezcla de enzimas conteniendo de 6 unidades de G6PDH + 3,45 unidades de FGI. La mezcla se dejó reaccionar y el aumento de  $A_{340}$  se registró gráficamente hasta que fue estable. La relación entre absorbancia y concentración de H6P, se estableció mediante curvas patrón de G6P en cada experimento. La cantidad de H6P se refirió al peso fresco de la hoja utilizada.

## **2.8. MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **2.8.1. Determinación de proteínas**

La determinación de proteínas en extractos de hoja se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Los extractos crudos o desalados se prepararon siguiendo la metodología descrita en el Apartado 2.3.1. La mezcla de reacción contenía 5 ml de reactivo de BIO-RAD, diluido 1:5 con agua destilada y filtrado a través de una capa de papel Wathman nº 1, al que se le añadía una alícuota de 100  $\mu$ l de la solución problema convenientemente diluida en su mismo tampón. Tras 30 min a temperatura ambiente, se determinaba la absorbancia de la muestra a 595 nm. Los datos se referían a una curva patrón construida con concentraciones conocidas de BSA (0 a 120  $\mu$ g proteína/100  $\mu$ l).

### **2.8.2. Determinación de pH**

Las medidas de pH se realizaron en un medidor de pH Crison modelo *micropH-2001* provisto de un electrodo Crison (Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España).

## 2.9. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

La inherente variabilidad de los procesos biológicos en los organismos vivos junto con el error experimental de los sistemas de medida, hace necesario el uso de una metodología de evaluación de los datos para establecer conclusiones a partir de los mismos (Heat, 1977; Parker, 1981).

Para analizar los resultados y su nivel de significación, éstos se han expresado normalmente como la media aritmética ( $\bar{x}$ )  $\pm$  el error estándar (ES), siendo:

$$\bar{x} = \sum x_i / n$$

$$ES = DS / \sqrt{n}$$

donde:

$\sum x_i$  = la suma de todos los valores de un mismo experimento.

n = número total de valores.

DS = desviación estándar de la muestra:  $DS = \sqrt{\left( \sum x_i^2 - \left( \sum x_i \right)^2 / n \right) / (n - 1)}$

La significación se ha establecido aplicando el test "*t de Student*". Este test es muy utilizado para determinar si, con un grado de significación o probabilidad dado, dos grupos de datos son o no significativamente diferentes. Se ha elegido un nivel mínimo de significación del 5%, considerado habitual en la mayoría de los trabajos biológicos.

En general, cuando se comparen dos poblaciones de datos, para el grado de

significación adoptado (5%), se indicará que no existen diferencias significativas entre las poblaciones cuando el valor de  $p$ , factor que representa la probabilidad de que los dos grupos de datos sean iguales, sea mayor de 0,05, mientras que se indicará que estas poblaciones son diferentes si  $p \leq 0,05$ .

## 2.10. REACTIVOS

Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizaron productos Panreac (España), grado purísimo. En los ensayos biológicos se utilizaron tampones y productos Merck (Alemania), calidad para análisis. NADH, azúcares, azúcares-fosfato y protectores enzimáticos fueron Sigma (EE. UU.) del mayor grado de pureza. El suministro de Fe-sequestrene fue gentileza de CIBA-GEIGY (Suiza).

Se emplearon gases puros o mezclas certificadas suministradas por SEO (Alphagaz, Madrid, España).

### ***III. RESULTADOS***

### 3.1 MODULACIÓN IN VIVO DE LA ACTIVIDAD NR DE HOJAS DE CEBADA

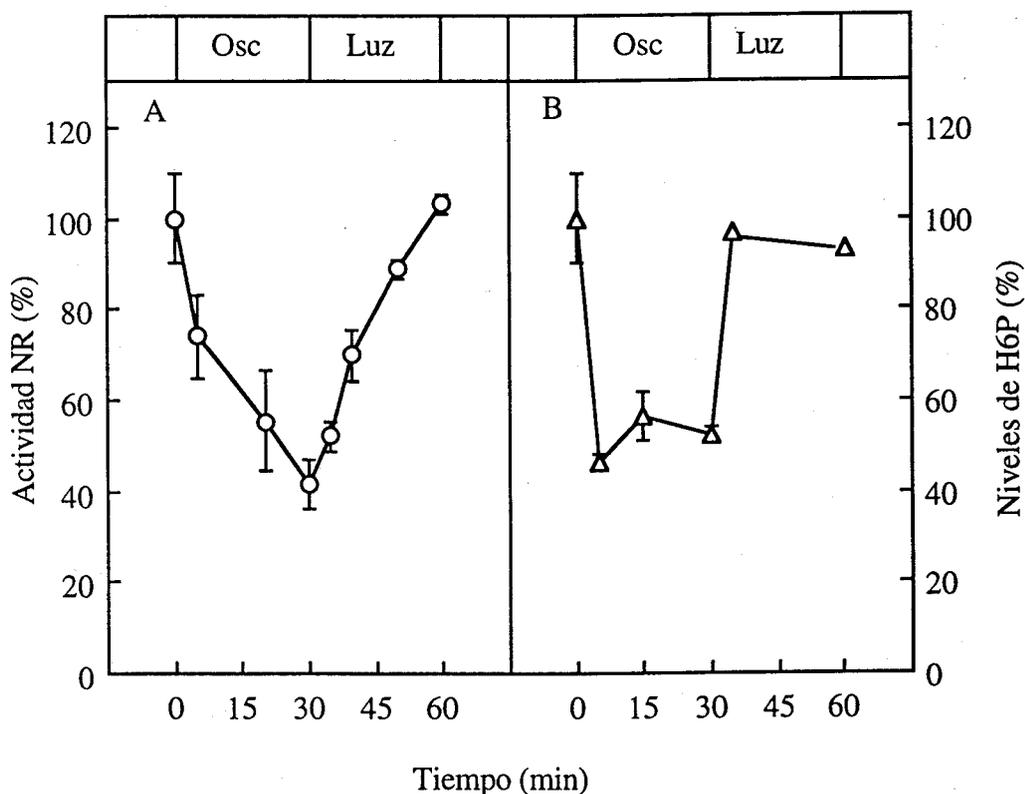
Los resultados obtenidos hasta el momento ponen de manifiesto que la regulación post-traducciona l de la NR foliar depende de la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub>. El objetivo fundamental de la primera parte de este trabajo consistió en estudiar la correlación entre la capacidad de asimilación de nitrato y la disponibilidad de carbohidratos en la hoja. Para ello es necesario conocer la actividad NR y los niveles de metabolitos procedentes de la fijación de CO<sub>2</sub>, en las mismas hojas y analizar la posible correlación entre dichos parámetros. Además, se requiere un método de análisis rápido que permita obtener muestras del tejido en un estado lo más próximo posible al existente in vivo (Wirtz et al., 1982; Seeman et al., 1985). En este caso se han obtenido extractos a partir de hojas de cebada congeladas instantáneamente en N<sub>2</sub> líquido, en los que se ha ensayado rápidamente la actividad NR (de Cires et al., 1993a) y determinado su contenido en azúcares-fosfato (Leegood y Furbank, 1986). Con este procedimiento se han detectado diferencias significativas en la actividad NR de la hoja así como en su contenido en azúcares-fosfato en respuesta a cambios en las condiciones de luz y disponibilidad de CO<sub>2</sub> o carbohidratos.

### 3.1.1 Dependencia por luz de la actividad NR y de los niveles de H6P en hojas de cebada

Cuando se determinaron los niveles de actividad NR en extractos de hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad (*Fig. 4*), se observó que tras 10 minutos en oscuridad la actividad NR descendía hasta un 60% de su valor inicial y hasta un 40% después de 30 minutos de tratamiento. De igual forma se produjo una rápida reactivación in vivo del enzima al reiluminar la planta, Tras 10 minutos se alcanzaron valores de un 70% de la actividad inicial y en 30 minutos los valores iniciales (*Fig. 4*). Paralelamente, los niveles de H6P disminuyeron un 50% tras 5 minutos en oscuridad y permanecieron estables mientras no cambiaron las condiciones de iluminación. Posteriormente, tras 5 minutos de reiluminación, se recuperaron los niveles iniciales de H6P (*Fig. 4*). Estos datos muestran una correlación directa entre actividad NR y niveles de H6P en la hoja, y que los cambios en los niveles de H6P preceden a aquellos que se producen en la actividad NR.

Resultados anteriores de nuestro grupo han puesto de manifiesto que el suministro de azúcares y azúcares-fosfato a hojas de cebada a través de la corriente de transpiración, da lugar a la protección de la NR frente a la inactivación in vivo por oscuridad (de Cires, 1996). Con objeto de determinar si existe una correlación entre esta protección y los niveles de H6P en la hoja, se determinaron en paralelo la actividad NR y los niveles de H6P en extractos de hojas de cebada a las que se les suministró Glc, DHAP, G6P y F6P a través de la corriente de transpiración, en transiciones luz-oscuridad (*Fig. 5*). En el panel A de la *Fig. 5* se observa que mientras la NR de hojas control se inactivó un 55% por oscuridad, en

**Fig. 4** *Actividad NR y niveles de H6P en hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz.*



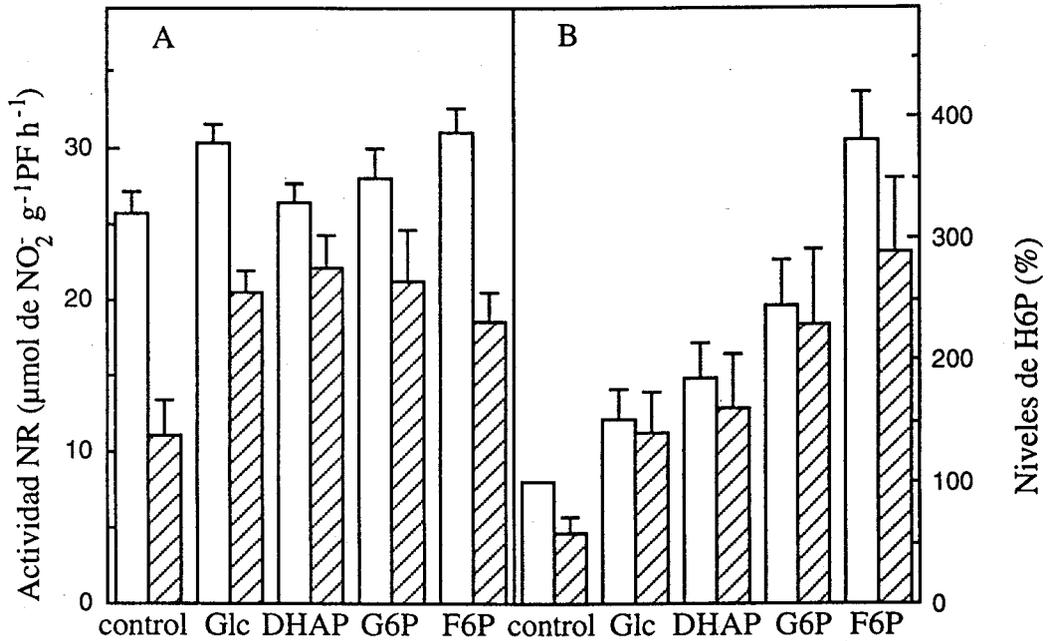
Tras dos horas de iluminación en condiciones de cultivo, las plantas se sometieron a 30 min de oscuridad y posteriormente se reiluminaron. A los tiempos indicados, se tomaron dos muestras de hojas que se sumergieron rápidamente en  $N_2$  líquido, en las que se determinó actividad NR (A) y niveles de H6P (B), respectivamente. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M. y M. apartado 2.3.1). Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes. El 100% de los niveles de hexosas 6-fosfato corresponde a  $228 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ PF}$ , el 100% de la actividad NR corresponde a  $18 \text{ } \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{ PF} \cdot \text{h}^{-1}$ .

hojas a las que se les suministró cualquiera de los azúcares ensayados no se produjo una inactivación significativa del enzima por oscuridad, encontrándose valores de actividad NR similares a los de hojas control en luz. Paralelamente, en condiciones de oscuridad los niveles de H6P de hojas control descendieron un 40%, poniendo de nuevo de manifiesto la correlación antes descrita entre actividad NR y niveles de H6P (*Fig. 5-B*). Sorprendentemente, aquellas hojas a las que se suministraron azúcares o azúcares-fosfato presentaron niveles de H6P significativamente mayores que los del control, tanto en condiciones de iluminación como de oscuridad, que oscilaron aproximadamente entre un 150% en el caso del suministro de glucosa y un 400% cuando se suministró F6P (*Fig. 5-B*). Estos datos ponen de manifiesto la estrecha correlación entre los niveles de H6P de hojas en oscuridad y la protección de la NR frente a la inactivación in vivo por oscuridad tras el suministro de azúcares o azúcares-fosfato a la hoja.

Como se ha descrito, el aumento de los niveles de azúcares-fosfato de hojas tratadas se produjo tanto en hojas en oscuridad como en hojas en luz. Sin embargo, en hojas en luz no se observaron diferencias significativas entre la actividad NR de las hojas control y de las hojas tratadas. Es decir el suministro de azúcares-fosfato a las hojas en luz que produjo un aumento de las H6P no se correspondió con una activación de la NR por encima de los valores del control.

La protección por azúcares fosfato de la NR, frente a la inactivación in vivo por oscuridad podría cursar por dos mecanismos diferentes: 1) actuando in vivo, sobre el mecanismo de regulación de la actividad NR o 2) actuando in vitro por acumulación de estos azúcares en el medio de ensayo. Para discernir entre estas dos posibilidades se realizaron ensayos similares a los anteriores, en extractos

**Fig. 5** Efecto del suministro de Glc, F6P, G6P y DHAP sobre la actividad NR y los niveles de H6P en hojas de cebada.

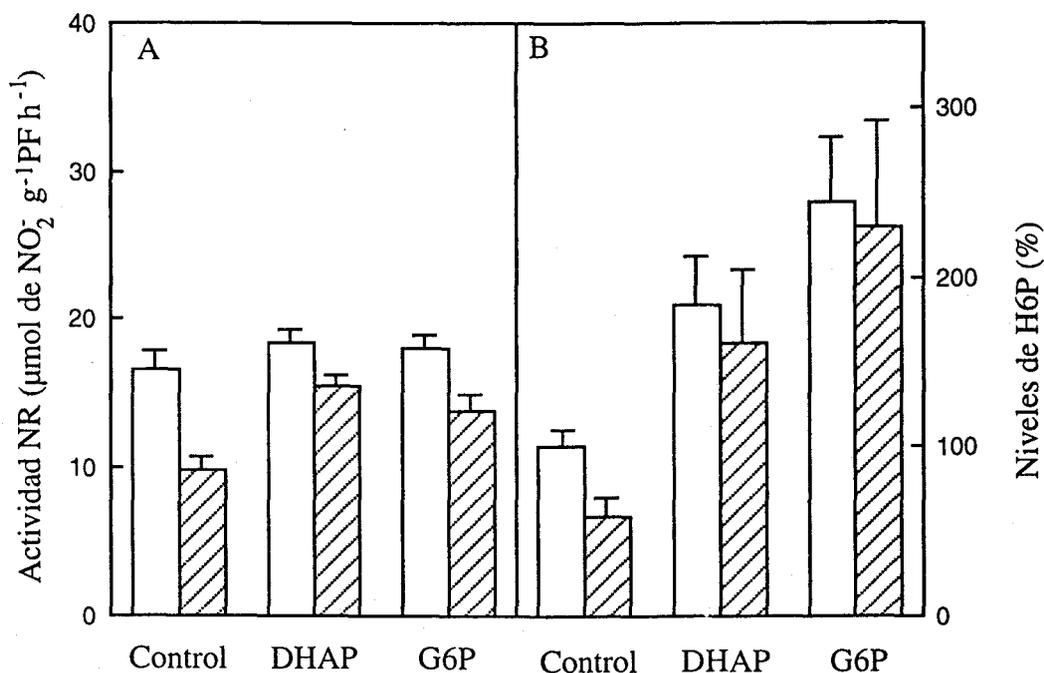


Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada o en las soluciones correspondientes, Glc, F6P, DHAP o G6P, 10 mM, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2). Después de 30 min en iluminación (□) y, en su caso, de 30 min de oscuridad (▨) se tomaron dos muestras de hojas que se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido, en las que se determinó actividad NR (A) y niveles de H6P (B), respectivamente. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M y M apartado 2.3). Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos independientes. El 100 % de los niveles de H6P corresponde a 191 nmol · g<sup>-1</sup> PF.

desalados, evitando de esta forma la posible acumulación de azúcares-fosfato en el medio de ensayo. Como se puede observar en la *Fig. 6* los valores de actividad NR obtenidos en este caso fueron siempre menores que aquellos que se obtenían en muestras sin desalar. No obstante, al igual que ocurría en el caso anterior se observa la inactivación in vivo por oscuridad de la NR de hojas control, así como la prevención frente a esta inactivación en aquellas muestras a las que se había suministrado a través de la corriente de transpiración cualquiera de los azúcares ensayados. Los resultados indican que las H6P actúan in vivo sobre el mecanismo de modulación de la actividad NR implicado en las transiciones luz oscuridad.

El conjunto de los resultados muestra: una correlación directa entre actividad NR y niveles de H6P en hojas sometidas a transiciones luz-oscuridad; que en estas transiciones los cambios en los niveles de H6P preceden a aquellos que se producen en la actividad NR y que la protección frente a la inactivación in vivo por oscuridad de la NR por suministro de azúcares-fosfato a través de la corriente de transpiración se correlaciona con el aumento de los niveles de H6P en las hojas tratadas.

**Fig 6.** *Efecto del suministro de G6P y DHAP sobre la actividad NR en extractos desalados y los niveles de H6P en hojas de cebada.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada, o en las soluciones correspondientes, DHAP o G6P, 10 mM, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2). Después de 30 min en iluminación (□) y, en su caso, de 30 min de oscuridad (▨) se tomaron dos muestras de hojas que se congelaron rápidamente en  $\text{N}_2$  líquido, en las que se determinó actividad NR tras desalar las muestras (A) y los niveles de H6P (B), respectivamente. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estandar (M y M apartado 2.3). Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes. El 100 % de los niveles de H6P corresponde a  $191 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$ .

### 3.1.2 Dependencia por CO<sub>2</sub> de la actividad NR y de los niveles de H6P en hojas de cebada

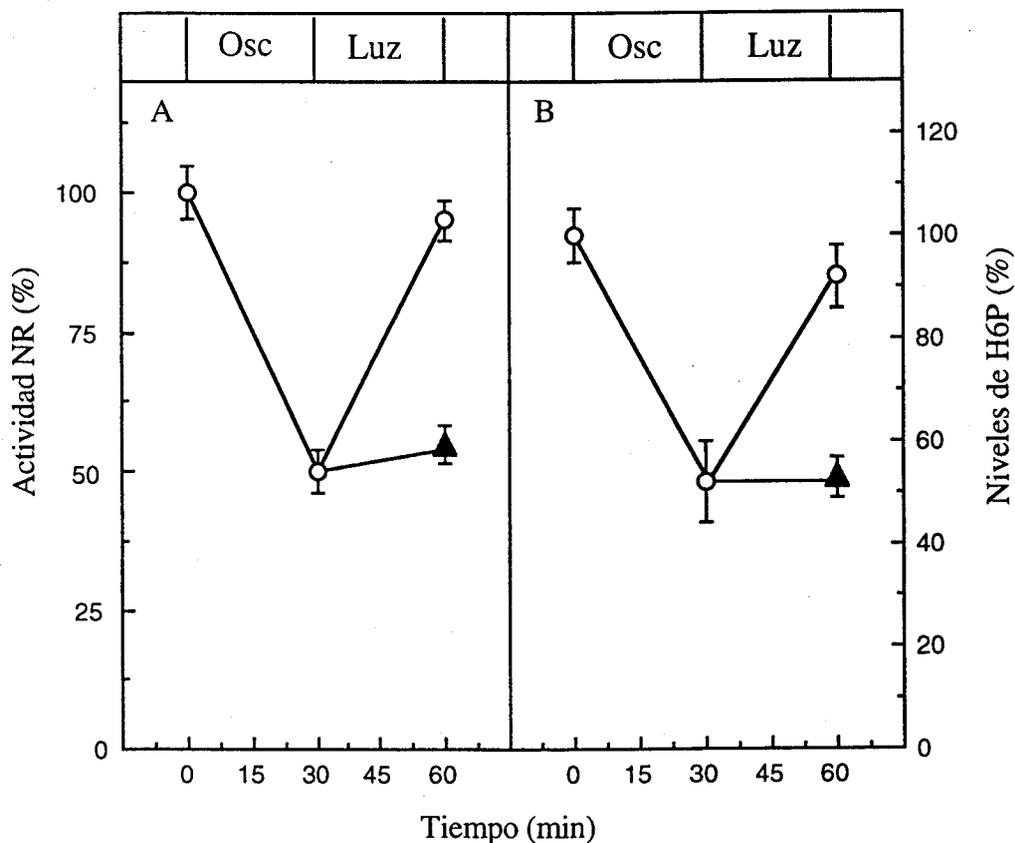
Kaiser y Foster (1989) pusieron de manifiesto que la reducción de nitrato en hojas de espinaca dependía de la disponibilidad de CO<sub>2</sub>. En el caso de hojas de cebada, la actividad NR es también dependiente de la fijación de CO<sub>2</sub>. Resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo han permitido determinar la actividad NR extraíble de hojas de cebada preincubadas en diferentes fases gaseosas y a diferentes intensidades de luz que permitieron obtener un rango amplio de velocidades de fijación de CO<sub>2</sub> (de Cires et al., 1993a). Las actividades más bajas se obtuvieron de hojas en aire y oscuridad. La actividad aumentó cuando a las hojas mantenidas en oscuridad se les excluyó el O<sub>2</sub> de la fase gaseosa. La luz (340  $\mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) en aire con 400 ppm de CO<sub>2</sub> produjo un incremento de la actividad NR, que alcanzó valores máximos en hojas incubadas en nitrógeno conteniendo 1000 ppm de CO<sub>2</sub> y alta luz (1800  $\mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Además con estos resultados fue posible establecer una correlación hiperbólica positiva entre actividad NR y fijación de CO<sub>2</sub> in vivo que puso en evidencia una cinética de saturación de la actividad NR respecto a la velocidad de fijación de CO<sub>2</sub> en la que la activación semimáxima de la NR se correspondía con valores de fijación de CO<sub>2</sub> del orden de 6  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (de Cires et al., 1993 a). A la vista de estos resultados, cabría esperar una correlación, también positiva, entre actividad NR y fijación de CO<sub>2</sub> por un lado y niveles de H6P por otro. Con objeto de analizar esta hipótesis, se determinaron en paralelo, niveles de H6P, actividad NR y fijación de CO<sub>2</sub>.

Mientras que fue relativamente simple establecer correlaciones entre los valores de actividad NR frente a pequeñas variaciones en las tasas de fijación de CO<sub>2</sub> (de Cires et al., 1993a), no fue tan fácil desde el punto de vista experimental establecer diferencias en los niveles de H6P en las mismas condiciones (datos no mostrados). Por tanto, se decidió determinar actividad NR y niveles de H6P en hojas de cebada sometidas a condiciones extremas de fijación de CO<sub>2</sub> en distintas situaciones experimentales: en un caso en condiciones de fotosíntesis similares a las de crecimiento (aire y 400  $\mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), en otro en las mismas condiciones pero en ausencia de CO<sub>2</sub> y en un tercero suministrando a las hojas inhibidores específicos de la fijación de CO<sub>2</sub>.

Como se mostraba en la *Fig. 4* la NR de hojas de cebada se inactiva in vivo tras someterlas a oscuridad y se reactiva al reiluminar las hojas. Además, estos cambios en la actividad NR se correlacionan con cambios en los niveles de H6P. Sin embargo, en la *Fig. 7* se observa que la NR permanece inactiva cuando la reiluminación se lleva a cabo en una fase gaseosa carente de CO<sub>2</sub>, situación en la que no se produce la recuperación de los niveles de H6P hasta valores control. Esto indica que la luz es condición necesaria pero no suficiente para producir la reactivación de la NR y que es preciso también restablecer una fijación de CO<sub>2</sub> activa que recupere los niveles de H6P.

En la *Fig. 8* se muestra la evolución de la actividad NR y los niveles de H6P en hojas de cebada sometidas a transiciones aire-[aire libre de CO<sub>2</sub>]-aire, en condiciones de luz continua. Como se puede observar el patrón de inactivación-reactivación es muy similar al que se obtiene al someter a las hojas a transiciones

**Fig 7.** *Actividad NR y niveles de H6P en hojas de cebada sometidas a transiciones luz-oscuridad-luz, en presencia o en ausencia de CO<sub>2</sub>.*

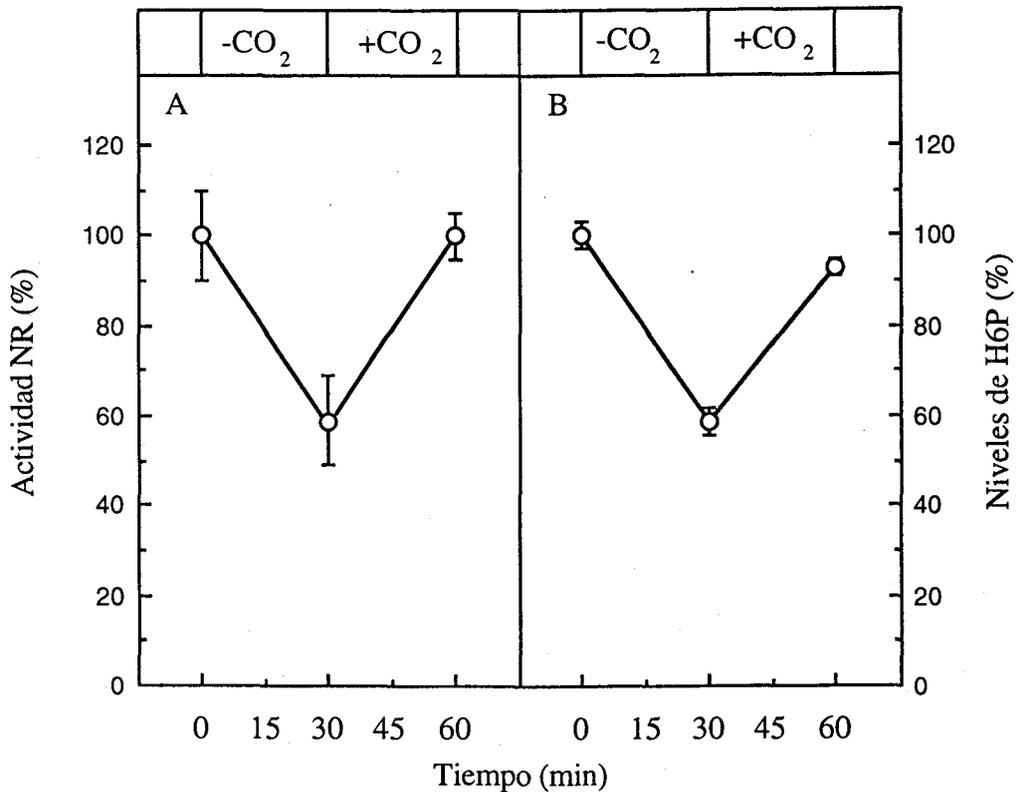


Se utilizaron plantas de cebadas iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2), se sometieron a 30 min de oscuridad y posteriormente se reiluminaron en aire (O) o en aire libre de CO<sub>2</sub> (▲). A los tiempos indicados, se tomaron dos muestras de hojas que se congelaron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido, en las que se determinó actividad NR (A) y niveles de H6P (B), respectivamente. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M y M apartado 2.3). Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes. El 100% de actividad NR y niveles de H6P fue de 20  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$  y 196  $\text{nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{PF}$ , respectivamente.

luz-oscuridad. La inactivación del enzima es muy rápida al pasar a las hojas a aire libre de CO<sub>2</sub>, disminuyendo la actividad NR inicial en un 40% tras 30 min de tratamiento. Paralelamente a esta inactivación de la NR, se produce un descenso similar en los niveles de H6P. Posteriormente, y tras 30 min de incubación en aire, se produce la reactivación del enzima, recuperándose los valores iniciales de actividad NR y de los niveles de H6P. De nuevo los resultados ponen de manifiesto la estrecha correlación entre los niveles de H6P, la fijación de CO<sub>2</sub> y la actividad NR en hojas de cebada.

Para corroborar los resultados anteriores se determinaron actividad NR, niveles de H6P y tasas de fijación de CO<sub>2</sub> en hojas de cebada a las que se les suministró, en condiciones de luz continua, glicolaldehído, un inhibidor del Ciclo de Calvin que actúa a nivel de la fase de regeneración de la RuP<sub>2</sub> (Sicher, 1984). En estas condiciones (*Tab. 4*), el suministro de glicolaldehído 50 mM, produjo una inhibición de la fijación de CO<sub>2</sub> del 80% y una disminución de la actividad NR de aproximadamente un 70%. Paralelamente se observó un descenso de los niveles de H6P de un 40%. Sin embargo, cuando se suministró a las hojas conjuntamente glicolaldehído, 50 mM y G6P, 20 mM, se observaron niveles de H6P seis veces superiores a los determinados en hojas control, y además se previno la inactivación de la NR, mientras que la fijación de CO<sub>2</sub> continuaba inhibida. Estos resultados corroboran la relación entre actividad NR, fijación de CO<sub>2</sub> y niveles de H6P. Además indican que la correlación directa entre actividad NR y fijación de CO<sub>2</sub> está producida por las variación en los niveles de H6P, puesto que la inactivación de la NR por inhibición de la fijación de CO<sub>2</sub> revierte mediante el suministro de azúcares-fosfato.

**Fig 8.** *Actividad NR y niveles de H6P en hojas de cebada sometidas a transiciones aire-[aire libre de CO<sub>2</sub>]-aire.*



Se utilizaron plantas de cebadas iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas, con su base sumergida en agua destilada, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2) y se incubaron bajo iluminación continua durante 30 min en aire libre de CO<sub>2</sub> y, posteriormente, de nuevo en aire. A los tiempos indicados, se tomaron dos muestras de hojas que se sumergieron rápidamente en N<sub>2</sub> líquido, en las que se determinó actividad NR (A) y niveles de H6P (B) respectivamente. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estándar (M y M apartado 2.3). Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos independiente. El 100% de actividad NR y niveles de H6P fue de 19,4 μmol NO<sub>2</sub><sup>-</sup> · g<sup>-1</sup> PF · h<sup>-1</sup> y 196 nmol · g<sup>-1</sup> PF, respectivamente.

**Tabla 4. Efecto del suministro de GA y/o G6P sobre la actividad NR, los niveles de H6P y la fijación de CO<sub>2</sub> de hojas de cebada en iluminación.**

Tratamiento	Actividad NR(%)	Niveles H6P(%)	Fijación de CO <sub>2</sub> (%)
Control	100	100	100
GA	31	62	20
GA + G6P	86	640	10

Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2h. Las hojas cortadas con su base sumergida en agua destilada, o en una solución que contenía GA 50 mM o GA 50 mM + G6P 20 mM, se dispusieron en una cámara de transpiración (M. y M. apartado 2.2). Después de 30 min en iluminación un tercio de las hojas se mantuvieron en la cámara para medir la fijación de CO<sub>2</sub> y el resto se congeló en N<sub>2</sub> líquido. La actividad NR se extrajo y ensayó en medio estandar (M.y M. apartado 2.3). Los niveles de H6P y la fijación de CO<sub>2</sub> se determinaron como se indica en M. yM. apartados 2.7 y 2.6.1 respectivamente. Se presentan los datos de un experimento representativo. El 100%de la actividad NR corresponde a 26,1  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ , en el caso de los niveles de H6P y fijación de CO<sub>2</sub> el 100% fue de 193  $\text{nmol H6P} \cdot \text{g}^{-1}\text{PF}$  y 9,1  $\mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  respectivamente.

El conjunto de estos resultados muestra que la luz no es condición suficiente para producir la reactivación de la NR, así como una estrecha correlación entre los niveles de H6P y la actividad NR en transiciones aire-[aire sin CO<sub>2</sub>]-aire. Todo ello permite proponer un modelo de actuación de las H6P in vivo en el que actuarían como señal reguladora modulando la actividad NR en función de las condiciones de fijación de CO<sub>2</sub>.

### 3.1.3 Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad NR.

En este apartado se planteó estudiar el efecto del aporte de nitrógeno sobre la actividad NR y los niveles de H6P de hojas de cebada en dos situaciones experimentales distintas: a) suministrando diferentes formas de nitrógeno a través de la corriente de transpiración a hojas de plantas cultivadas con 15 mM nitrato, y b) cultivando las plantas con distintas fuentes de nitrógeno, esto es, nitrato, amonio o nitrato y amonio en distintas proporciones.

En una primera aproximación experimental, se suministró, a través de la corriente de transpiración, nitrato o amonio (a concentraciones de 10 mM durante 30 min) a hojas de cebada y se determinó actividad NR y niveles de H6P en diferentes condiciones de fotosíntesis (*Tab. 5*). Cuando el suministro se realizó en las condiciones de cultivo (aire y  $350 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), no se encontraron diferencias significativas ni en la actividad NR ni en los niveles H6P, en ninguno de los tratamientos (*Tab. 5*). Sin embargo, si tras el tratamiento anterior las hojas se incubaban en condiciones de máxima fotosíntesis (5%  $\text{CO}_2$  y  $1500 \mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), la actividad NR y los niveles de H6P eran en todos los casos significativamente más altos que los obtenidos tras el primer tratamiento, independientemente de la fuente de nitrógeno proporcionada a las hojas (*Tab. 5*). Es interesante señalar que, en esta situación de máxima fotosíntesis, tampoco se observaron diferencias significativas ni en actividad NR ni en los niveles de H6P entre los diferentes tratamientos. Estos resultados indican, 1) que los aumentos rápidos de las concentraciones de nitrato o amonio en las hojas no dan lugar a cambios significativos en la actividad NR y en los niveles de H6P de las mismas, 2) que el sistema de activación del enzima responde más a las condiciones en las que

**Tabla 5. Actividad NR y niveles de H6P de hojas de cebada, en diferentes condiciones fotosintéticas, tras suministrarles nitrato o amonio.**

Tratamiento	Baja fotosíntesis		Alta fotosíntesis	
	Actividad NR	H6P	Actividad NR	H6P
Control	20,5±1,0	164±15	26,4±2,6	295±18
Nitrato	20,0±0,6	156±13	25,6±1,4	283±15
Amonio	21,0±1,1	149±16	29,1±2,6	277±19

Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante 2h en condiciones de cultivo. Las hojas cortadas con su base sumergida en agua destilada (control), KNO<sub>3</sub>, 10 mM o NH<sub>4</sub>Cl, 10 mM se dispusieron en una cámara de transpiración. Un grupo de hojas se incubó con aire y 350  $\mu\text{mol}$  fotones  $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (baja fotosíntesis), tras el tratamiento se congelaron en nitrógeno líquido para determinar la actividad NR y los niveles de H6P. Otro grupo de hojas se incubó en aire con un 5% de CO<sub>2</sub> y 1500  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  durante 20 minutos (alta fotosíntesis). Después de esto, las hojas se congelaron en nitrógeno líquido para determinar la actividad NR y los niveles de H6P en estas condiciones. Los niveles de H6P y la actividad NR se determinaron como se indica en M. yM. apartados 2.7 y 2.3 respectivamente. y se expresan como  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$  y  $\text{nmol H6P} \cdot \text{g}^{-1}\text{PF}$ , respectivamente.

se favorece la fijación  $\text{CO}_2$  in vivo que a las de suministro de nitrógeno y, 3) que en cualquiera de las condiciones se manifiesta la correlación entre la actividad NR y los niveles de H6P en la hoja.

Como se ha indicado en la introducción en plantas herbáceas como la cebada, el sitio fundamental de asimilación de nitrato hasta aminoácidos es la hoja, donde este anión llega desde la raíz, vía xilema. Cuando la única fuente de nitrógeno disponible es el nitrato, la hoja exporta vía floema los aminoácidos sintetizados a los tejidos no fotosintéticos. Cuando la fuente de nitrógeno disponible es el amonio, la situación fisiológica cambia, puesto que este ion es asimilado hasta aminoácidos en la misma raíz, no existiendo translocación de amonio a la hoja (Lewis et al., 1986). En estas condiciones, la raíz requiere un aporte extra de esqueletos carbonados desde la hoja para la biosíntesis de aminoácidos, que serán luego exportados al resto de la planta. Cuando en el medio de cultivo coexisten el nitrato y el amonio es posible alterar la relación fuente-sumidero de las hojas variando la proporción de nitrato y amonio suministrados a la planta en el medio de cultivo. De este modo, se modifica la proporción de fotosintato utilizado en la hoja respecto del exportado a la raíz para suministrar los esqueletos carbonados necesarios para incorporar el nitrógeno amínico en uno u otro órgano.

Siguiendo este planteamiento, en la segunda aproximación experimental, se determinó la actividad NR y los niveles de H6P en hojas de cebada cultivadas con diferentes concentraciones de nitrato y/o amonio (*Tab. 6*). Se observó que la actividad NR final ( $V_f$ ) que refleja la cantidad total de enzima, en extractos de hojas en luz era muy similar en todos los casos. De hecho, no se encontró ninguna

diferencia significativa en  $V_f$  entre plantas cultivadas con nitrato como única fuente de nitrógeno (a concentraciones de 15 o 8,7 mM) y aquellas cultivadas con amonio 8 mM y concentraciones progresivamente menores de nitrato (3, 1,5 y 0,7 mM). Los datos indican que la utilización de amonio como fuente de nitrógeno no tiene efectos negativos sobre la expresión de la NR en la hoja, y que concentraciones de nitrato tan bajas como 0,7 mM en un medio basado en amonio, son suficientes para inducir la expresión del enzima foliar en niveles similares a los expresados en otros medios con nitrato como única fuente de nitrógeno. (*Tab. 6*; Larsson, 1994).

Analizando las respectivas actividades NR iniciales ( $V_i$ ) que reflejan el estado de activación del enzima, en extractos de hojas en luz (*Tab. 6*), se observó que no hubo diferencias significativas entre plantas cultivadas con nitrato como única fuente de nitrógeno y aquellas cultivadas con amonio y concentraciones progresivamente menores de nitrato de hasta 1,5 mM. Los datos indican que, en condiciones de luz, el estado de activación de la NR no experimentó ningún cambio cuando se modificó el suministro de nitrógeno como nitrato desde el 100% hasta el 16% de nitrógeno total en el medio. Sin embargo, cuando la concentración de nitrato en el medio era 0,7 mM (8% del nitrógeno total), la actividad NR inicial era significativamente menor para actividades NR finales similares. En esas condiciones, la actividad NR inicial era sólo el 50% de la encontrada en extractos de plantas cultivadas en cualquier otra condición, poniendo de manifiesto una disminución en el estado de activación del enzima, independientemente de las condiciones de iluminación (*Tab. 6*). Estos datos sugieren que, en plantas cultivadas con más del 90% del nitrógeno total proporcionado en forma de

**Tabla 6. Actividad NR de hojas de cebada en iluminación o en oscuridad, cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno.**

Fuente de nitrógeno		Actividad NR			
		Luz		Oscuridad	
Nitrato	Amonio	V <sub>i</sub>	V <sub>f</sub>	V <sub>i</sub>	V <sub>f</sub>
15,0	0	20±0,5	24±0,3	9±0,5	20±0,9
8,7	0	19±1,1	22±0,4	8±0,3	19±1,7
7,5	7,5	21±0,3	25±0,9	8±0,9	20±0,5
3,0	8,0	20±0,5	25±0,2	8±0,6	20±0,8
1,5	8,0	19±0,8	23±0,3	7±1,0	20±0,9
0,7	8,0	7±1,0	22±1,4	4±0,4	19±1,5

La plántulas se iluminaron durante 2 h en condiciones de cultivo (iluminación) y en su caso, posteriormente se sometieron a 30 min de oscuridad (oscuridad). La actividad NR se determinó como se indica en M. yM. apartado 2.3 y se calculó como V<sub>i</sub> (0-2 min del ensayo) y V<sub>f</sub> (6-10 min del ensayo), y está expresada como  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ .

amonio, en las que la asimilación de nitrógeno tiene lugar principalmente en la raíz, el déficit en los niveles de carbohidratos en la hoja como consecuencia de la exportación masiva hacia la raíz da lugar a una inactivación reversible de la NR foliar aún en condiciones de luz.

Además cuando tras dos horas en luz en condiciones de cultivo, las plantas se sometieron a un período de 30 min de oscuridad se observó que, para  $V_f$  similares a las determinadas en luz, los valores de  $V_i$  eran significativamente más bajos, como corresponde a la manifestación de la inactivación inducida por oscuridad (*Tab. 6*). En estas condiciones, la  $V_i$  de la NR extraída de hojas de plantas cultivadas en medios con amonio conteniendo nitrato 0,7 mM era también significativamente inferior (aproximadamente la mitad) a la determinada en hojas de plantas cultivadas en los demás medios de cultivo. Esto indica que la NR en estas condiciones puede alcanzar mayores niveles de inactivación por oscuridad y que el sistema tiene capacidad de respuesta a los cambios metabólicos que experimenta la planta en la transición luz-oscuridad.

Por tanto, se ha interpretado que en estas condiciones los niveles de efectores de la NR foliar (i. e. niveles de carbohidratos en la hoja) eran muy bajos en ambas condiciones: primero, como consecuencia del corto período en oscuridad y en segundo lugar, por la exportación masiva de carbohidratos desde la hoja a la raíz, para sustentar la asimilación de nitrógeno en este tejido.

Para comprobar esta posibilidad, se determinaron los niveles de H6P en extractos de hojas de plantas cultivadas en las condiciones de aporte de nitrógeno antes descritas, y después de someterlas a condiciones de luz y oscuridad (*Tab. 7*).

Los niveles de H6P en extractos de hojas en luz eran similares en plantas cultivadas con nitrato como única fuente de nitrógeno (15 y 8,7 mM nitrato) y aquellas cultivadas con concentraciones equimolares de nitrato y amonio (7,5 mM nitrato amónico). Sólo cuando el nitrato constituyó el 8% del nitrógeno total en los medios (medio de cultivo conteniendo 8 mM amonio + 0.7 mM nitrato), los niveles H6P fueron el 50% de los determinados en las condiciones inicialmente descritas (*Tab. 7*). Los datos indican que, evidentemente, bajo estas condiciones de cultivo, se produjo una exportación masiva de productos de la asimilación de CO<sub>2</sub> (probablemente como sacarosa) desde las hojas a la raíz, para sustentar la asimilación de nitrógeno en este tejido. Es interesante señalar que, paralelamente a esta disminución en los niveles de H6P, la NR resultaba también inactivada (*Tab. 6*), lo que pone de manifiesto una correlación directa entre los niveles de H6P y el estado de activación del enzima. Cuando las plantas se sometieron a 30 min. de oscuridad, se observó una disminución significativa del 50% en los niveles del H6P en todos los casos. Esta observación también está de acuerdo con la propuesta. En condiciones de oscuridad, la inhibición de la asimilación de CO<sub>2</sub> disminuye los niveles intracelulares de carbohidratos y, por tanto, la inactivación reversible de la NR. Además, en plantas cultivadas en oscuridad con el 8% del nitrógeno total como nitrato, los niveles de H6P disminuyeron aún más, alcanzando éstos un 40% de los determinados en luz (*Tab. 7*).

En conjunto los resultados obtenidos ponen de manifiesto una vez más, la existencia de una correlación directa entre los niveles de hexosas 6-fosfato en la hoja y la actividad NR de la misma y están de acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, en la que los niveles de productos de la asimilación de CO<sub>2</sub>, más

**Tabla 7. Niveles de hexosas-fosfato (H6P) en hojas de cebada en iluminación y oscuridad cultivadas con diferentes fuentes de nitrógeno.**

Fuente de nitrógeno		Niveles de hexosas-fosfato	
Nitrato (mM)	Amonio (mM)	Luz	Oscuridad
15,0	0	100	48
8,7	0	96	50
7,5	7,5	85	48
0,7	8	52	42

Las plántulas se iluminaron durante 2 h en condiciones de cultivo (iluminación) y en su caso, posteriormente se sometieron a 30 min de oscuridad (oscuridad). Los niveles de carbohidratos se determinaron como se describe en M. y M. apartado 2.7 El 100% corresponde a 170 nmol H6P · g<sup>-1</sup>PF. Los datos corresponden a un experimento significativo.

concretamente las H6P, actuarían como efectores positivos de la actividad NR foliar. Ésta y los niveles de H6P serían bajos en ambas situaciones: en las hojas de plantas cultivadas con nitrato, como consecuencia del período en oscuridad y en las hojas iluminadas de plantas cultivadas fundamentalmente con amonio, como resultado de la translocación de carbohidratos a la raíz para aportar los esqueletos carbonados requeridos en la asimilación de amonio. Tras un período de oscuridad de las hojas de plantas cultivadas fundamentalmente con amonio, el estado de activación de la NR disminuye aún más, lo que indica la sensibilidad del sistema a una disminución suplementaria en los niveles de carbohidratos de la hoja.

### 3.2 MODULACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD NR DE HOJAS DE CEBADA

En este capítulo se ha estudiado comparativamente la sensibilidad in vitro a diferentes efectores de la NR extraída de hojas de cebada en luz y en oscuridad.

Los estudios sobre la modulación in vivo realizados sobre hojas de cebada y descritos en el capítulo anterior, muestran que la NR se puede extraer en dos estados de activación diferentes en función de las condiciones de iluminación o fijación de CO<sub>2</sub> a las que se hayan sometido las plantas. Así, la NR obtenida de plantas en luz presenta valores de actividad mayores que la obtenida de hojas en oscuridad. De igual forma, si las hojas se incuban en luz con aire libre de CO<sub>2</sub> se extrae la NR en una forma con menor actividad que aquella que se extrae de hojas incubadas en las condiciones de cultivo. Esta inactivación in vivo se observa cuando se utilizan medios de extracción y ensayo que contienen agentes quelantes como EDTA y Pi (medio estándar). Sin embargo, la inactivación de la NR de hojas de espinaca por oscuridad o ausencia de CO<sub>2</sub> requiere la presencia de concentraciones milimolares de Mg<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup> en el medio de ensayo, para ser detectada (Kaiser y Spill 1991; Huber et al., 1992a). En el caso del enzima de hojas de espinaca este último aspecto se ha explicado en base a que el proceso de inactivación in vivo del enzima consistiría en la fosforilación del mismo, condición necesaria, pero no suficiente, ya que además se requeriría la presencia de cationes divalentes que permitan la unión de una proteína inhibidora. El mecanismo que opera en cebada no solo resulta diferente en cuanto al requerimiento por cationes divalentes, sino que además en estudios previos de nuestro laboratorio no ha sido posible reproducir los experimentos de inactivación de la NR por incubación con

ATP. No obstante, el enzima sí se inhibe in vitro por iones  $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$  en ausencia de agentes quelantes (de Cires et al., 1993a)

Por otro lado, de nuestros estudios in vivo se desprende la existencia de una correlación directa entre el estado de activación de la NR y los niveles de H6P de la hoja. Así, la NR extraída de hojas en condiciones de cultivo en iluminación, en las que existen altos niveles de H6P presenta una mayor actividad que la obtenida de hojas en oscuridad, ausencia de  $CO_2$  en iluminación o que exporta el fotosintato a la raíz, condiciones todas ellas en las que presentan bajos niveles de H6P (menores del 50% del control). Además, se puede prevenir in vivo que la NR pase a su forma menos activa forzando un aumento de los niveles de H6P de la hoja, mediante el suministro de azúcares a través de la corriente de transpiración.

Por todo ello, se ha estudiado el efecto in vitro de diferentes azúcares-fosfato sobre la NR de hojas de cebada, así como el efecto del  $Mg^{2+}$  y la relación entre ambos efectores, con objeto de establecer un modelo conjunto de regulación de la actividad NR por  $Mg^{2+}$  y azúcares fosfato que permita explicar e integrar los resultados obtenidos hasta el momento.

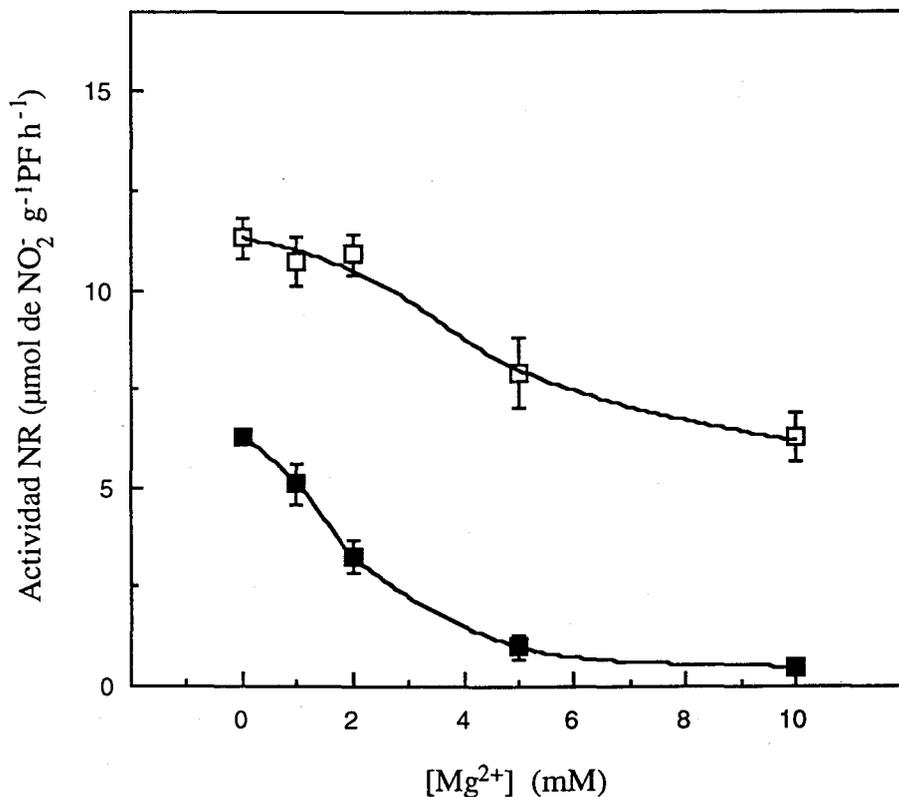
### 3.2.1 Sensibilidad a $Mg^{2+}$ de la actividad NR de hojas de cebada

Como se ha descrito en el apartado 2.2 de M. y M. los resultados que se presentan en este nuevo apartado se han obtenido utilizando medios de extracción y ensayo que no contenían EDTA ni Pi ya que su capacidad para quelar iones no permite observar el efecto in vitro del  $Mg^{2+}$  sobre la NR (*Fig. 2*).

En la *Fig. 9* se representan los valores de actividad NR de hojas de cebada en luz y en oscuridad extraída y ensayada en ausencia o en presencia de concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$ . Los resultados muestran que el enzima extraído de hojas en luz y en oscuridad se inhibía in vitro por  $Mg^{2+}$ , aunque de forma diferente. La NR de hojas en luz no se inhibió de forma significativa a concentraciones de  $Mg^{2+}$  inferiores a 2 mM. La adición de este ion hasta concentraciones de 10 mM produjo una inhibición que llegó a ser del 37%. La NR de hojas en oscuridad, sin embargo, se inhibió de forma significativa incluso a concentraciones de  $Mg^{2+}$  1 mM. Cuando se ensayaron concentraciones de  $Mg^{2+}$  2 mM, la inhibición de la NR fue del 50% y se produjo la inhibición prácticamente total del enzima a concentraciones de  $Mg^{2+}$  de 10 mM.

Estos resultados muestran de forma evidente que para cualquier concentración de  $Mg^{2+}$  ensayada la NR obtenida de hojas en oscuridad se inhibió de forma significativamente mayor que aquella obtenida de hojas en luz, lo cual indica que la NR de hojas en oscuridad es una forma del enzima más sensible a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  que la NR de hojas en luz. Esta diferencia en la sensibilidad también se manifiesta en las concentraciones de  $Mg^{2+}$  para las que se logra la inhibición semimáxima de la NR; así, para la NR de hojas de luz, la

**Fig 9.** *Inhibición por  $Mg^{2+}$  de la actividad NR en extractos de hojas de cebada en iluminación o en oscuridad.*



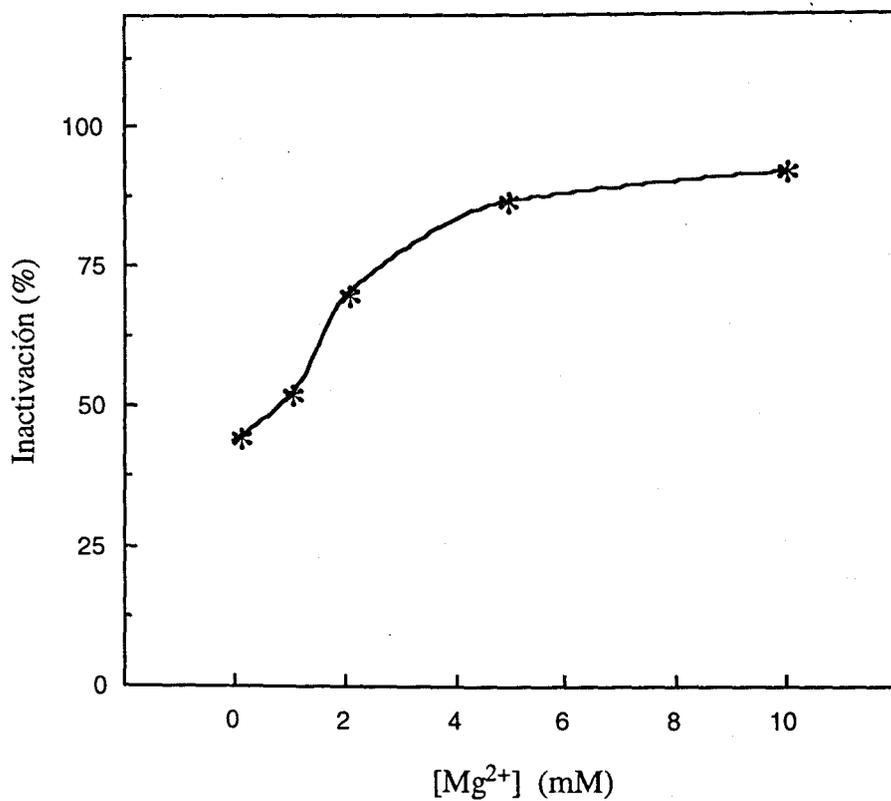
Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo (□) y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad (■). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Los extractos se prepararon, desalaron y ensayaron en medio base (M. y M. apartado 2.3) a las concentraciones indicadas de Mg<sup>2+</sup>. Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos independientes.

inhibición semimáxima por  $Mg^{2+}$  se obtenía a concentraciones superiores a 10 mM, mientras que en el caso de la NR de hojas en oscuridad se alcanzaba a concentraciones de 2 mM.

Cuando se calcula el porcentaje de inactivación por oscuridad de la NR ensayada a diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$ , a partir de los datos representados en la *Fig. 9*, se puede observar que en ausencia de  $Mg^{2+}$ , la inactivación por oscuridad determinada in vitro es del 44% y aumenta al incrementar la concentración de  $Mg^{2+}$  en los ensayos, hasta obtener valores de inactivación máximos próximos al 90%, a concentraciones de  $Mg^{2+}$  superiores a 5 mM (*Fig. 10*). Los datos ponen de manifiesto que la inactivación in vivo de la NR por oscuridad se observa in vitro incluso en ausencia de  $Mg^{2+}$ , hecho que constituye una diferencia fundamental de la NR de hojas de cebada respecto al enzima de otros orígenes, en los que la presencia de  $Mg^{2+}$  es esencial para detectar in vitro la inactivación in vivo por oscuridad (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991; Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992a). Por otra parte, es evidente que la presencia de este ion en los medios de extracción y ensayo acentúa las diferencias entre la actividad NR de hojas en luz y de hojas en oscuridad. Por tanto, es posible distinguir dos inhibiciones aditivas sobre la NR de hojas de cebada: una inactivación in vivo por oscuridad, independiente de  $Mg^{2+}$ , y una inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  que se superpone a la anterior (de Cires et. al., 1993a; de Cires 1996)

Con objeto de profundizar en el estudio del efecto inhibitor in vitro del  $Mg^{2+}$  sobre la NR foliar y poder establecer el modo de acción del mismo se han caracterizado algunos parámetros cinéticos del enzima ( $V_{max}$ ,  $K_m$  y eficiencia

**Fig 10.** *Efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la inactivación in vivo por oscuridad de la NR de hojas de cebada en función de la concentración de  $Mg^{2+}$  en el ensayo*



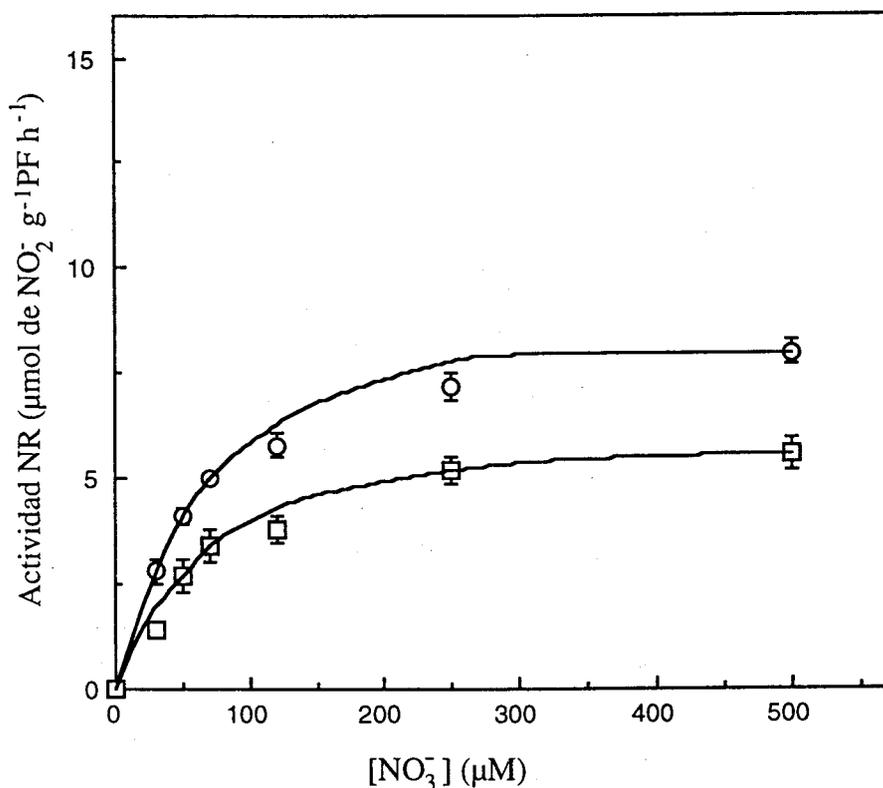
Se representan los valores de inactivación in vivo por oscuridad de la NR extraída y ensayada a diferentes concentraciones de  $Mg^{2+}$ , calculados a partir de los datos que se representan en la Fig. 9.

catalítica para el  $\text{NO}_3^-$ ) en presencia y en ausencia de este ion, tanto en el enzima de hojas en luz como en el de oscuridad.

Al representar los valores de actividad NR de hojas en luz en función de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en el medio de ensayo, se obtuvieron típicas cinéticas hiperbólicas (*Fig. 11*). En ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , la  $V_{\text{max}}$  de la NR fue de  $8,9 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$  y su  $K_m$  para nitrato de  $61 \mu\text{M}$  (*Tab. 8*). Estos valores de  $K_m$  son similares a los descritos para la NR procedente de diferentes especies y ensayada en distintas condiciones (Guerrero et al., 1981; Campbell 1989 ; Dwivedi et al., 1994; Trimboli y Barber 1994; Ratnam et al., 1995; Barber et al., 1997; Lillo et al., 1997; Ratnam et al., 1997; Su et al., 1997). Cuando los ensayos se realizaron en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  10 mM, la  $V_{\text{max}}$  fue de  $6,6 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$  y la  $K_m$  para el nitrato de  $77,8 \mu\text{M}$ . Con estos datos se ha calculado el efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la eficiencia catalítica del enzima (apartado 2.3.2 M. y M.), parámetro que nos permite comparar su especificidad por el sustrato en presencia de los distintos efectores (*Tab. 8*). Los resultados obtenidos muestran que en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  la eficiencia catalítica del enzima desciende un 40% aproximadamente.

En la *Fig. 12* se muestran los valores de actividad obtenidos cuando estos ensayos se realizaron a partir de extractos de hojas en oscuridad. Se observan, al igual que ocurría en el caso anterior, típicas cinéticas hiperbólicas. En ausencia de efectores, los valores obtenidos de  $V_{\text{max}}$  y  $K_m$  para la NR fueron de  $5,5 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$  y  $24 \mu\text{M}$ , respectivamente. La presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  en los ensayos dio lugar a un descenso drástico de la  $V_{\text{max}}$  del enzima que pasa a ser de  $1 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ , algo menor del 20% del control sin  $\text{Mg}^{2+}$ , resultando por

**Fig 11.** *Efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la cinética de actividad de la NR de hojas de cebada en iluminación en función de la concentración de nitrato .*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en  $N_2$  líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se ensayó en el mismo medio, sin adiciones (O), o añadiendo  $Mg^{2+}$ , 10 mM (□) y a las concentraciones indicadas de  $NO_3^-$  en cada caso. Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes.

**Tabla 8.**  $V_{max}$  y  $K_m$  para el nitrato de la NR de hojas de cebada en iluminación, ensayada en ausencia y presencia de  $Mg^{2+}$

Tratamiento	$V_{max}$ (a)	$K_m$ ( $\mu M$ )	Eficiencia catalítica (b)
Control	8,9 $\pm$ 0,2	61 $\pm$ 4	100%
MgCl <sub>2</sub>	6,6 $\pm$ 0,4	77,8 $\pm$ 15	58%

Datos calculados a partir de la Fig. 11, con el programa Leonora desarrollado por Athel Cornish-Bowden.

(a)  $\mu mol NO_2^- \cdot g^{-1}PF \cdot h^{-1}$

(b) Eficiencia catalítica expresada como porcentaje frente al control. El 100% corresponde a 146  $\mu mol \cdot mM^{-1} \cdot g^{-1}PF \cdot h^{-1}$  (expresado como  $V_{max}/K_m$ ).

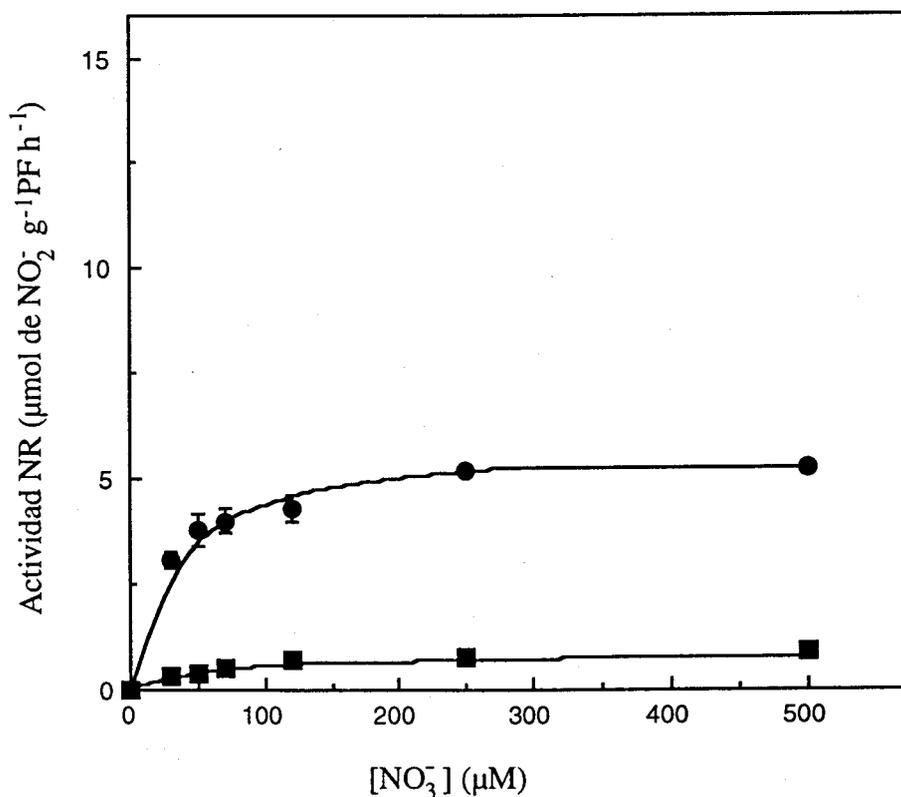
Condiciones como en la Fig. 11.

tanto el enzima de hojas en oscuridad mucho más sensible a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  que el enzima de hojas en luz (*Tab. 9*). Además, la  $K_m$  alcanza un valor de  $75 \mu M$ , tres veces superior al del control sin  $Mg^{2+}$  (*Tab. 9*). En este caso, también se han comparado las eficiencias catalíticas del enzima de hojas en oscuridad en las diferentes condiciones de ensayo. Los datos obtenidos muestran que la presencia de  $Mg^{2+}$  produce un descenso de la eficiencia catalítica de un 95%. El enzima de hojas en oscuridad se caracteriza, por tanto, por una fuerte sensibilidad a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  (*Tab. 9*).

Los resultados muestran que el  $Mg^{2+}$  produce la disminución de la  $V_{max}$  de la NR de hojas en luz y en oscuridad (*Tabs. 8 y 9*), lo que indicaría que el  $Mg^{2+}$  no actúa como un inhibidor competitivo del enzima. Esta modificación de las propiedades catalíticas del enzima permite proponer un modelo de acción en el que el  $Mg^{2+}$  establecería una interacción con el enzima a través de un sitio de unión diferente de aquel al que se unen cualquiera de los sustratos ( $NADH$  y  $NO_3^-$ ).

Por otro lado, si se comparan los valores de las cinéticas de actividad obtenidos para la NR de hojas en luz con los obtenidos para el enzima extraído de hojas en oscuridad (*Figs. 11 y 12*), se observa, que en ausencia de  $Mg^{2+}$  se produce un descenso de la  $V_{max}$  y de la  $K_m$  para la NR de hojas en oscuridad respecto a la de hojas en luz. Estos resultados muestran que la modificación del enzima al ser sometido a un período de oscuridad se manifiesta en un cambio en sus parámetros cinéticos incluso en ausencia de efectores. Además, el enzima de hojas en oscuridad, es más sensible a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ . Esto pone de manifiesto la naturaleza diferente que tienen la NR de hojas en luz, y la NR de hojas en oscuridad.

**Fig 12.** *Efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la cinética de actividad de la NR de hojas de cebada en oscuridad en función de la concentración de nitrato.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo y sometidas posteriormente a 30 min de oscuridad. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en  $N_2$  líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se ensayó en el mismo medio, sin adiciones (●), o añadiendo  $Mg^{2+}$ , 10 mM (■) y a las concentraciones indicadas de  $NO_3^-$  en cada caso. Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes.

**Tabla 9.**  $V_{max}$  y  $K_m$  para el nitrato de la NR de hojas de cebada en oscuridad ensayada en ausencia y presencia de  $Mg^{2+}$

Tratamiento	$V_{max}$ (a)	$K_m$ ( $\mu M$ )	Eficiencia catalítica (b)
Control	$5,5 \pm 0,2$	$24 \pm 2$	100%
$MgCl_2$	$1 \pm 0,1$	$75 \pm 2$	3,5%

Datos calculados a partir de la Fig. 12, con el programa Leonora desarrollado por Athel Cornish-Bowden.

(a)  $\mu mol NO_2^- \cdot g^{-1}PF \cdot h^{-1}$

(b) Eficiencia catalítica expresada como porcentaje frente al control. El 100% corresponde a  $230 \mu mol \cdot mM^{-1} \cdot g^{-1}PF \cdot h^{-1}$  (expresado como  $V_{max}/K_m$ ).

Condiciones como en la Fig. 12.

En conjunto, los resultados indican que el  $Mg^{2+}$  inhibe tanto a la NR de luz como a la de oscuridad. No obstante, el efecto sobre la NR de oscuridad es significativamente mayor que sobre la NR de luz. Por tanto, aunque en hojas de cebada es posible apreciar las diferentes propiedades del enzima de luz y de oscuridad en ausencia de cualquier efector, cuando los ensayos se llevan a cabo en presencia de  $Mg^{2+}$ , se observa un mayor porcentaje de inactivación in vivo por oscuridad. Además, la interpretación de las cinéticas obtenidas permite proponer al  $Mg^{2+}$  como un inhibidor de la NR, cuyos efectos más evidentes son la disminución de la  $V_{max}$ , y, fundamentalmente, el fuerte descenso de la eficiencia catalítica del enzima para el nitrato.

### 3.2.2 Activación in vitro de la NR extraída de hojas de cebada por productos de la fijación de CO<sub>2</sub>.

Como se ha descrito en el apartado 3.1.1, el suministro de azúcares o azúcares-fosfato a la hoja a través de la corriente de transpiración produjo un aumento de las H6P y la prevención de la NR frente a la inactivación in vivo por oscuridad. Por tanto, una vez evidenciado su efecto in vivo se estudió comparativamente el efecto in vitro de diversos azúcares y azúcares-fosfato sobre la actividad NR de hojas en luz y en oscuridad.

A diferencia de los ensayos realizados en los estudios in vivo, los resultados que se presentan a continuación corresponden a ensayos realizados en extractos de hojas de cebada en luz y en oscuridad obtenidos, desalados y ensayados en medios carentes de EDTA y Pi, esto es, en medio base, ya que la presencia de estos componentes enmascara el efecto de los metabolitos ensayados (*Fig. 2*).

Resultados previos de nuestro grupo pusieron de manifiesto que la actividad NR en extractos de hojas de cebada en luz y en oscuridad no se modificó significativamente cuando se ensayó en presencia de glucosa, fructosa y dihidroxiacetona a concentraciones de hasta 25 mM (de Cires, 1996), indicando que estos azúcares carecen de capacidad para activar al enzima in vitro.

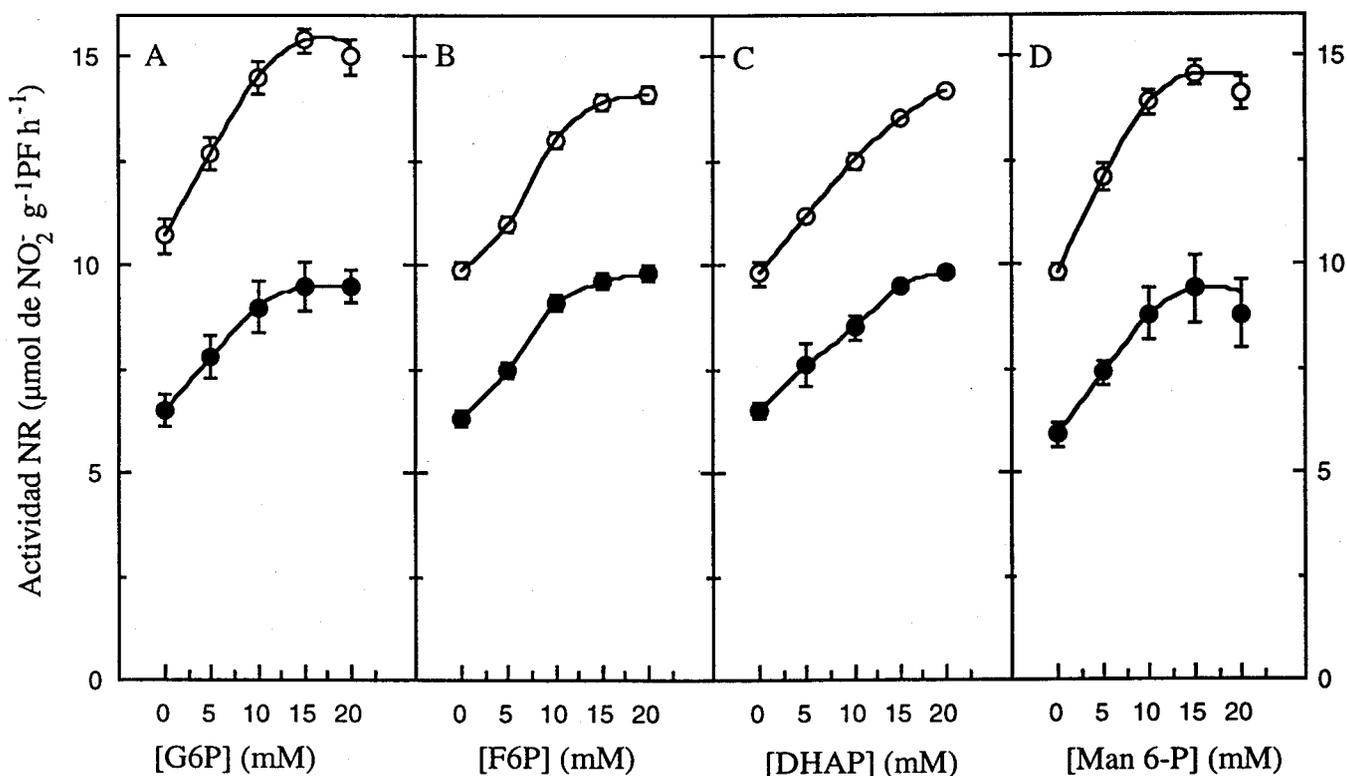
En la *Fig. 13* se presentan las curvas de activación in vitro de la NR extraída de hojas en luz y en oscuridad por diferentes azúcares-fosfato. En el panel A, se observa que el incremento en la concentración de G6P en los ensayos desde 0 hasta 20 mM, produjo una activación tanto de la NR de hojas de luz como de oscuridad, con características similares. La activación era prácticamente lineal hasta

valores de concentración próximos a 15 mM y saturaba a concentraciones superiores. Los valores de máxima activación por G6P fueron de un 40% para el enzima extraído de hojas de luz, y de un 46% en el caso del enzima de oscuridad (*Tab. 10*). Por tanto, la G6P produce la activación in vitro de la NR extraída de hojas en luz y en oscuridad con características similares, que alcanza su máximo a concentraciones de entre 15 y 20 mM.

Cuando los ensayos de actividad NR se llevaron a cabo en presencia F6P (*Fig. 13-B*), se obtuvieron cinéticas de activación similares a las obtenidas al utilizar G6P. Los valores de máxima activación de la NR se lograron a concentraciones de F6P de entre 15 y 20 mM, siendo éstos de un 42 y un 55% para la NR de hojas en luz y en oscuridad, respectivamente (*Tab. 10*). Cuando se ensayó la DHAP (*Fig. 13-C*), de nuevo las curvas de actividad NR, presentaron patrones de activación similares a los obtenidos con G6P y F6P. Los valores de máxima activación fueron de un 44 y un 58% para la NR extraída de hojas en luz y en oscuridad respectivamente a concentraciones de DHAP entre 15 y 20 mM (*Tab. 10*).

Como se ha indicado anteriormente, para determinar diferencias en el estado de activación del enzima in vivo, se ha utilizado un método de extracción y ensayo rápido de la actividad NR foliar de cebada que implica trabajar con extractos crudos. En estas condiciones, además de la extracción de la actividad NR, estaríamos extrayendo otras actividades enzimáticas implicadas en la interconversión de azúcares-fosfato. Por tanto, se podrían estar dando fenómenos de interconversión enzimática de los azúcares in vitro, por lo que su efecto activador sobre la NR no sería causado directamente por el azúcar-fosfato

**Fig 13.** *Activación in vitro por azúcares-fosfato de la NR de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad, en medio base.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo (O) y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad (●). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3) La actividad NR se determinó en el mismo medio a las concentraciones indicadas de los diferentes azúcares-fosfato. Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos independientes.

**Tabla 10. Activación máxima y concentración para la cual se obtiene la activación semimáxima con los diferentes azúcares fosfato.**

	Luz		Oscuridad	
	Activación (%)	C. Ac. Sem. <sup>(a)</sup>	Activación (%)	C. Ac. Sem. <sup>(a)</sup>
G6P	40±4	5,5	46±6	5,5
F6P	42±2	5,7	55±2	5,6
DHAP	44±4	6,3	58±4	6
Man6-P	45±2	5	49±11	6

Datos obtenidos a partir de las Fig. 13. Condiciones como las indicadas en la Fig. 13

(a) Concentración de efector para la que se logra la mitad de la activación máxima, expresada en mM

ensayado en cada caso. Estos mecanismos de interconversión, se han evitado, en parte, mediante el desalado de las muestras, que elimina en gran medida los sustratos de los sistemas enzimáticos implicados. No obstante, para descartar esta posibilidad se caracterizó el efecto in vitro de un epímero de la G6P escasamente metabolizable, la manosa 6-P (Man 6-P). En el panel D (*Fig. 13*) se muestran las curvas de actividad NR obtenidas cuando estos ensayos se realizaron en presencia de diferentes concentraciones de Man 6-P. Tanto en extractos de hojas en luz como en oscuridad, se obtuvieron curvas de activación de la NR con características similares a aquellas obtenidas cuando los ensayos se realizaron en presencia de G6P. La máxima activación de la NR de hojas en luz se alcanzó para concentraciones de Man 6-P de entre 15 y 20 mM y fue de un 45% (*Tab. 10*). Para estas mismas concentraciones de Man 6-P se obtuvo la máxima activación del enzima de hojas en oscuridad que fue de un 49% (*Tab. 10*). Además el efecto activador de los azúcares fosfato in vitro sobre la NR resulta ser inmediato, puesto que ni, la incubación previa con éstos ni su adición a los medios de extracción dio como resultado diferencias significativas en los patrones de activación obtenidos (datos no mostrados). Estos resultados indican que al menos el efecto activador de la G6P no se debe a los productos procedentes de su metabolización in vitro.

En la *Tab. 10* se comparan las características de las curvas de activación de la NR por azúcares-fosfato. Se muestra la máxima actividad NR obtenida en presencia de cada uno de los azúcares-fosfato ensayados y la concentración de efector para la cual se logra la activación semimáxima. Para la NR extraída de hojas en luz se obtuvieron valores de máxima activación similares en todos los casos de alrededor de un 40%. La máxima activación de la NR de hojas en oscuridad también fue similar en todos los casos y de alrededor de un 50%. La activación

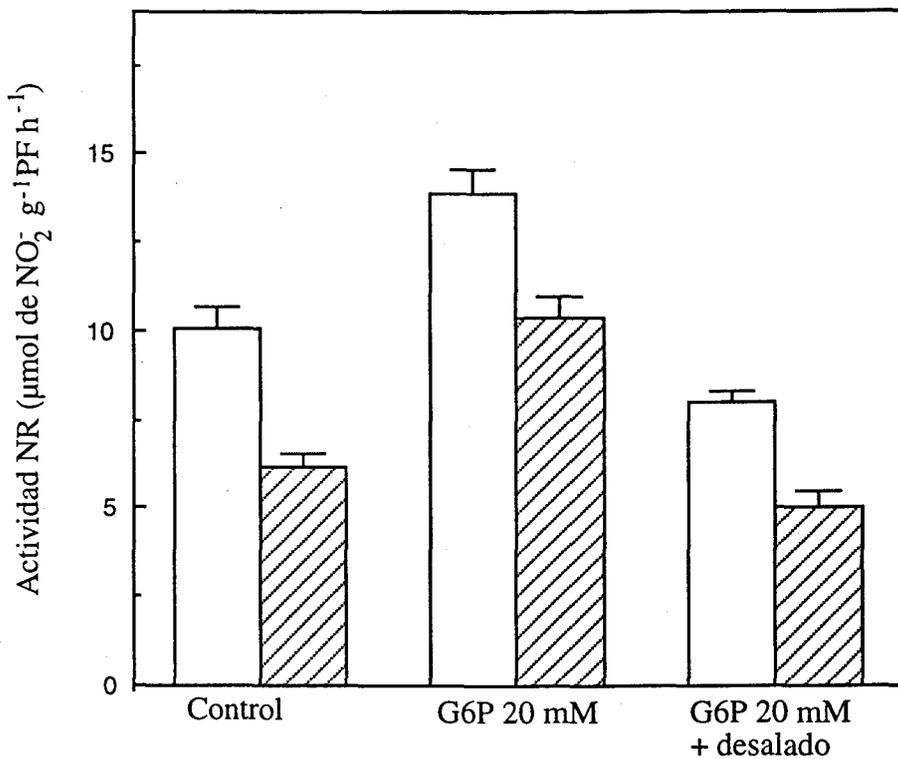
semimáxima se logró para concentraciones de azúcares-fosfato de entre 5 y 6 mM en extractos de hojas en luz y en oscuridad. El conjunto de estos resultados muestra que en extractos crudos desalados de hojas de cebada cualquiera de los azúcares-fosfato ensayados produjo la activación in vitro de la NR con características similares.

Si el efecto activador de los azúcares-fosfato in vitro sobre la NR fuera estable en el tiempo, la eliminación de estos efectores del medio de ensayo no revertiría la activación del enzima. Para comprobar esta hipótesis se determinó la actividad NR en extractos de hojas en luz y en oscuridad en presencia de G6P y tras su eliminación del medio de ensayo por desalado de las muestras (*Fig. 14*). Se observa que tanto el enzima extraído de hojas en luz como el de hojas en oscuridad se activa in vitro por G6P, con características similares a las descritas anteriormente. Sin embargo, cuando se eliminaba la G6P por desalado de las muestras, se revertía su efecto activador sobre el enzima. Esto indica que la presencia de G6P, y probablemente del resto de azúcares-fosfato es imprescindible para que se manifieste la activación de la NR.

En conjunto estos resultados indican que el efecto activador in vitro de los azúcares-fosfato sobre la NR no debe estar mediado por un mecanismo de modificación covalente del enzima sino más bien por interacción directa con el mismo, siendo necesaria la presencia del efector para producir dicha activación.

Como se ha indicado con anterioridad, la NR procedente de hojas en oscuridad es diferente de la que se extrae de hojas en luz. Es interesante señalar, que el enzima de oscuridad no adquiere las propiedades del enzima de luz en

**Fig 14.** *Reversión de la activación inducida por G6P de la NR de hojas de cebada en iluminación y oscuridad.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo ( $\square$ ) y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad ( $\text{▨}$ ). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3) y se ensayaron en el mismo medio sin adiciones o en presencia de G6P 20 mM. Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes.

ninguno de los ensayos in vitro que se han realizado con los diferentes azúcares-fosfato. Si tuviese lugar esta transición cabría esperar que para concentraciones saturantes del activador, todo el enzima en el ensayo presentara las características del de luz. Esto es, a concentraciones saturantes de azúcares-fosfato no se observaría in vitro la inactivación in vivo por oscuridad, ya que independientemente del origen del enzima, todo se encontraría en su forma de máxima actividad. Sin embargo, esto no es así; en la *Fig. 13* se observa claramente que el efecto activador in vitro de los azúcares fosfato ensayados sobre la NR de hojas en iluminación y en oscuridad satura a concentraciones de aproximadamente 15 mM, a pesar de lo cual se determinan diferencias de actividad entre la NR de hojas en luz y en oscuridad cercanas a un 40%.

Como se concluía de los estudios in vivo la acumulación de H6P en la hoja previene la inactivación in vivo por oscuridad. Los resultados obtenidos a partir de los estudios realizados in vitro muestran que la activación de la NR por azúcares-fosfato no consiste en la transición del enzima de oscuridad al de iluminación sino en la activación de cada una de estas formas. Además esta activación in vitro no es estable en el tiempo y es necesaria la presencia de los azúcares-fosfato en el medio de ensayo. En conjunto, los resultados permitirían proponer dos niveles de acción de los azúcares-fosfato sobre la NR foliar de cebada: in vivo previenen la inactivación por oscuridad inhibiendo el mecanismo implicado, e in vitro interaccionan directamente con la NR y producen su activación independientemente de que el enzima se haya extraído de hojas en luz o en oscuridad.

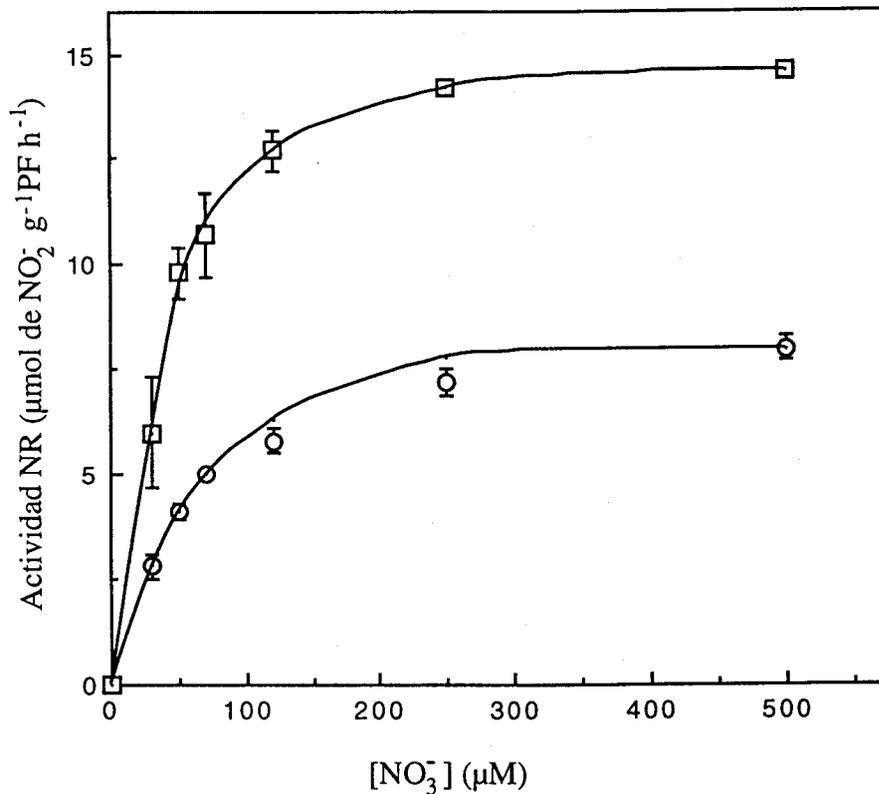
Para caracterizar con más detalle el efecto activador in vitro de los azúcares-

fosfato sobre la actividad NR extraída de hojas en iluminación y en oscuridad, se han determinado algunos parámetros cinéticos del enzima en presencia y en ausencia de azúcares-fosfato, concretamente G6P y a diferentes concentraciones de  $\text{NO}_3^-$ .

Cuando los ensayos se llevaron a cabo en extractos de hojas en luz, se obtuvieron curvas de activación de la NR que presentaron típicas cinéticas hiperbólicas (*Fig. 15*). La  $V_{\max}$  que se obtuvo en presencia de G6P fue de  $15,7 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ , lo que representa un valor de actividad NR un 75% superior al que se obtiene en ausencia de G6P (*Tab. 11*). En presencia de G6P, la  $K_m$  para el nitrato fue de  $31 \mu\text{M}$ , mientras que en los ensayos control el valor obtenido fue de  $61 \mu\text{M}$  (*Tab. 11*). Cuando los ensayos se realizaron en extractos de hojas en oscuridad, también se obtuvieron típicas cinéticas hiperbólicas (*Fig. 16*). En presencia de G6P se obtuvo un valor de  $V_{\max}$  de  $8,8 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$ , lo que representó también en este caso un aumento de la  $V_{\max}$  frente al control sin efector de aproximadamente un 60%. Sin embargo, la presencia de G6P en los medios de ensayo no produjo variaciones significativas de la  $K_m$  del enzima para el nitrato, que fue de  $22 \mu\text{M}$ , similar a la obtenida en ausencia del efector (*Tab. 12*).

A partir de los parámetros cinéticos obtenidos, es posible calcular la relación entre la eficiencia catalítica de la NR en presencia y en ausencia de G6P (apartado 2.3.2 de M. y M.). La G6P produjo un aumento de la eficiencia catalítica del enzima extraído en las dos condiciones (luz, oscuridad), aunque este efecto fue

**Fig 15.** *Efecto de la G6P sobre la cinética de actividad de la NR de hojas de cebada en iluminación en función de la concentración de nitrato.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se ensayó en el mismo medio, sin adiciones (O), o añadiendo G6P, 15 mM (□) y a las concentraciones indicadas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en cada caso. Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos independientes.

**Tabla 11.  $V_{max}$  y  $K_m$  para el nitrato de la NR de hojas de cebada en iluminación ensayada en ausencia y presencia de G6P**

Tratamiento	$V_{max}$ (a)	$K_m$ ( $\mu$ M)	Eficiencia catalítica (b)
Control	8,9 $\pm$ 0,2	61 $\pm$ 4	100%
G6P	15,7 $\pm$ 0,3	31 $\pm$ 2	342%

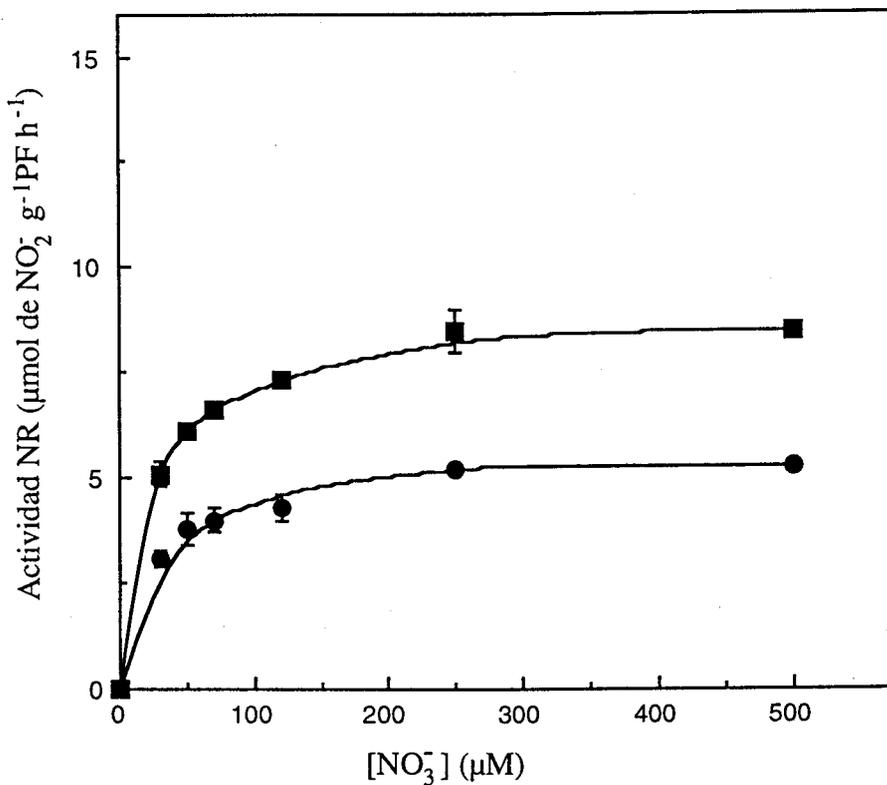
Datos calculados a partir de la Fig. 15, con el programa Leonora desarrollado por Athel Cornish-Bowden.

(a)  $\mu$ mol  $\text{NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$

(b) Eficiencia catalítica expresada como porcentaje frente al control. El 100% corresponde a 146  $\mu$ mol  $\cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$  (expresado como  $V_{max}/K_m$ ).

Condiciones como en la Fig. 15.

**Fig 16.** *Efecto de la G6P sobre la cinética de actividad de la NR de hojas de cebada en oscuridad en función de la concentración de nitrato.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo y sometidas posteriormente a 30 min de oscuridad. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se ensayó en el mismo medio, sin adiciones (●), o añadiendo G6P 15 mM (■) y a las concentraciones indicadas de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en cada caso. Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos independientes.

**Tabla 12.  $V_{max}$  y  $K_m$  para el nitrato de la NR de hojas de cebada en oscuridad ensayada en ausencia y presencia de G6P**

Tratamiento	$V_{max}$ (a)	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	Eficiencia catalítica (b)
Control	$5,5 \pm 0,2$	$23,9 \pm 2$	100%
G6P	$8,8 \pm 0,1$	$22 \pm 1,4$	171%

Datos calculados a partir de la Fig. 16, con el programa Leonora desarrollado por Athel Cornish-Bowden.

(a)  $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$

(b) Eficiencia catalítica expresada como porcentaje frente al control. El 100% corresponde a  $146 \mu\text{mol} \cdot \text{mM}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}\text{PF} \cdot \text{h}^{-1}$  (expresado como  $V_{max}/K_m$ ).

Condiciones como en la Fig. 16.

más significativo para la NR de luz que triplicó su eficiencia catalítica (*Tabls. 11 y 12*).

En conjunto los resultados muestran que in vitro los azúcares-fosfato producen la activación de la NR de hojas en luz o en oscuridad. Este efecto se observa a tiempo cero y únicamente si el efector se mantiene en el medio de ensayo, lo que indica una acción inmediata debida a una interacción no covalente con el enzima. Además la naturaleza de este mecanismo de activación in vitro no implicaría la transición entre la NR de luz y la NR de oscuridad. Por tanto los resultados apuntan hacia una interacción de los azúcares-fosfato con la NR que produce un aumento de su  $V_{\max}$  y sobre todo un fuerte incremento de su eficiencia catalítica que es más evidente para la NR de iluminación.

### 3.2.3 Efecto protector de los azúcares fosfato frente a la inhibición in vitro por $Mg^{2+}$ .

Los resultados descritos hasta el momento muestran cómo los azúcares fosfato, y concretamente la G6P, ejercen un importante papel sobre la regulación de la NR de hojas de cebada a dos niveles diferentes: primero, in vivo, implicados en la transición entre las formas de luz y de oscuridad; y segundo, in vitro, activando el enzima en cualquiera de sus formas.

Por otra parte, como se ha puesto de manifiesto en el apartado 3.2.1, el  $Mg^{2+}$  también está implicado en la modulación in vitro de la actividad NR, con un mecanismo de acción similar al descrito para los azúcares-fosfato, pero de signo contrario, esto es, inhibiendo al enzima. La implicación de estos dos efectores en la regulación de la actividad NR, plantea la posibilidad de la existencia de un sistema de modulación conjunto, por azúcares fosfato y  $Mg^{2+}$ , que actuaría sobre la NR incluso antes de que se produjese cualquier modificación covalente del enzima. Por ello, se ha estudiado in vitro el efecto combinado de estos efectores sobre la actividad NR extraída de hojas en luz y en oscuridad, con objeto de establecer un modelo conjunto de modulación por  $Mg^{2+}$  y azúcares-fosfato que permita explicar e integrar los resultados obtenidos hasta el momento.

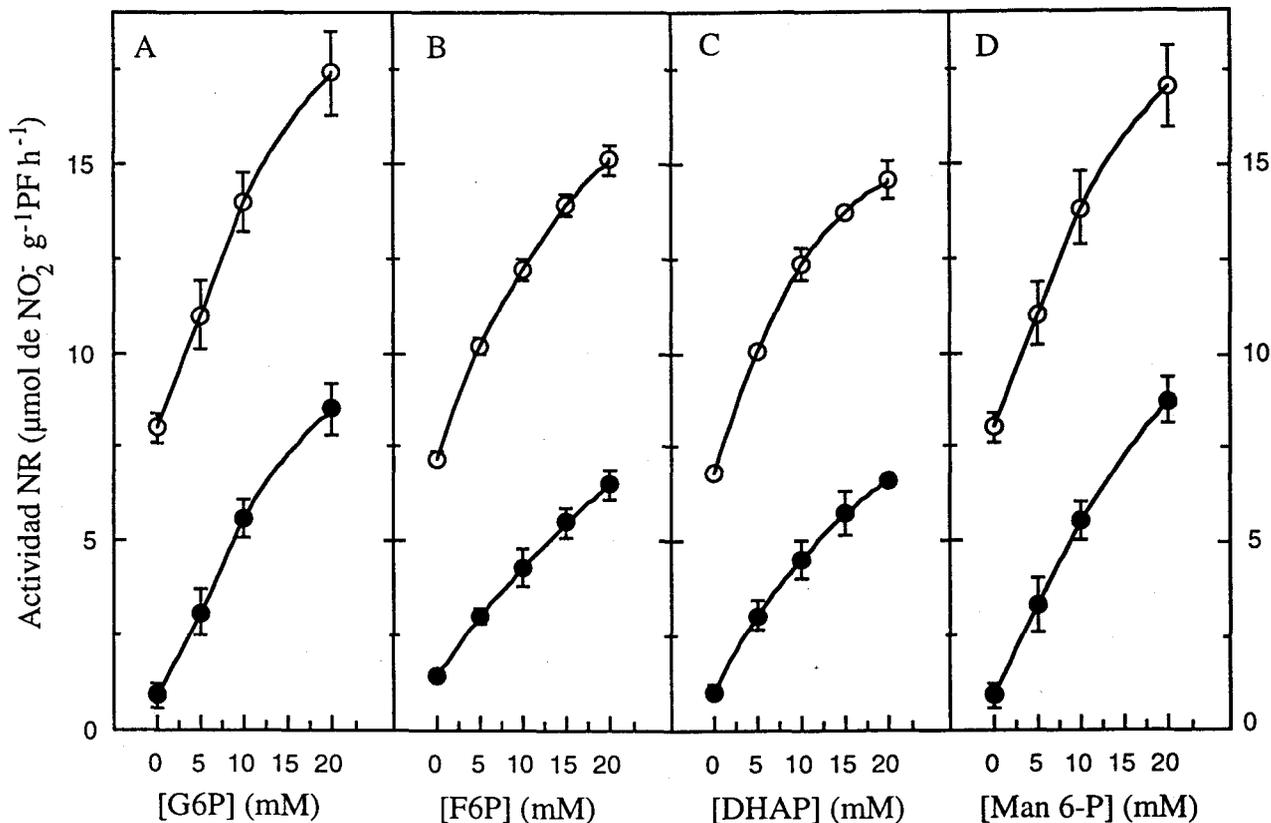
En la *Fig. 17* se muestran las curvas de activación in vitro por diferentes azúcares-fosfato de la NR extraída de hojas en luz y en oscuridad y ensayada en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM. En el panel A, se muestra la actividad NR de hojas de cebada en luz y en oscuridad ensayadas a concentraciones de G6P entre 5 y 20 mM. El enzima obtenido de hojas en luz o en oscuridad resultaba activado por

G6P, siendo esta activación mucho mayor para la NR de hojas en oscuridad. Así, cuando el enzima se extraía de hojas en luz, la máxima activación de la NR se obtenía para concentraciones de G6P de 20 mM y era de aproximadamente el 120%. Sin embargo, la máxima activación de la NR obtenida de hojas en oscuridad fue de aproximadamente un 840% y se obtuvo también a concentraciones de G6P de 20 mM. Como se ha indicado anteriormente (apartado 3.2.2), la posible interacción de la G6P in vitro con la NR de hojas en luz o en oscuridad daría lugar a una forma más activa del enzima. En estas condiciones, además, el enzima está sometido a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ , y puesto que el enzima de hojas en oscuridad es más sensible a esta inhibición, el efecto activador por G6P es más patente en este caso.

También se estudió el efecto activador in vitro sobre la NR de otros azúcares-fosfato, más concretamente F6P y DHAP, en presencia de  $Mg^{2+}$ . En los dos casos se obtuvieron resultados similares a los obtenidos con G6P, siendo la única diferencia significativa el efecto sobre el enzima de oscuridad en el que las activaciones fueron inferiores; 375% en presencia de F6P y 509% en presencia de DHAP (*Fig. 17- B y C*).

Para poner en evidencia que, al igual que ocurría en los ensayos realizados en medio base, el efecto activador de estos azúcares fosfato no era consecuencia de un proceso de interconversión de azúcares en el extracto, se obtuvieron las curvas de activación in vitro de la NR por Man6-P. Como se muestra en la *Fig. 17-D*, la Man6-P produjo una activación del enzima con características similares a las de la G6P, siendo la activación máxima de un 110% para la NR de hojas en luz y de un 865% para la de hojas en oscuridad.

**Fig 17.** *Activación in vitro por azúcares-fosfato de la NR de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad en medios que contienen  $Mg^{2+}$  5mM.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo (O) y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad (●). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en  $N_2$  líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio con  $Mg^{2+}$ , 5 mM (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se determinó en el mismo medio a las concentraciones indicadas de los diferentes azúcares-fosfato. Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes.

En la *Tab. 13* se muestra la máxima activación de la NR obtenida en presencia de cada uno de los azúcares-fosfato ensayados y la concentración de efector para la cual se logra la activación semimáxima. Para la NR de hojas en luz, los valores de máxima activación fueron similares en todos los casos y de aproximadamente un 115 % respecto al control. En el caso de la NR de hojas en oscuridad sin embargo sí se dieron diferencias significativas entre la activación producida por F6P y DHAP que fue de un 430% como valor medio y la producida por G6P y su epímero la Man 6-P que activaron en un 850%. Por otra parte la activación semimáxima se logró a concentraciones de efector entre 7 y 8 mM en todos los casos, tanto para la NR de hojas en luz como en oscuridad.

Es evidente que un posible mecanismo por el que los azúcares-fosfato producirían esta activación in vitro de la NR en medios con  $Mg^{2+}$  podría estar mediado por la capacidad quelante de estos azúcares-fosfato (O'Sullivan y Smithers, 1979). De esta forma, la presencia de los azúcares-fosfato en el medio de ensayo daría lugar a una concentración efectiva de  $Mg^{2+}$  inferior a la adicionada. Debido al efecto inhibitor de este ion sobre la actividad NR, esta disminución de la concentración efectiva de  $Mg^{2+}$  en el medio se manifestaría como un aumento de la actividad del enzima. Para analizar este posible efecto se han llevado a cabo una serie de experiencias que se describen a continuación.

En primer lugar, se ha calculado la concentración de  $Mg^{2+}$  libre, y por tanto efectiva, en cada una de las situaciones experimentales correspondientes al ensayo descrito en la *Fig. 17-A*. Los valores obtenidos se presentan en la *Tab. 14*. Se observa que, como consecuencia de la capacidad quelante de la G6P, el aumento de la concentración de la misma en los medios de ensayo, da lugar a la disminución

**Tabla 13. Activación máxima y concentración para la cual se obtiene la activación semimáxima con diferentes azúcares fosfato, ensayados en medio con  $Mg^{2+}$  5mM.**

	Luz		Oscuridad	
	Activación (%)	Ac. semimáx. (a)	Activación (%)	Ac. semimáx. (a)
G6P	118±7	7,5	844±6	7,5
F6P	110±2	7	364±2	7,5
DHAP	112±4	7	509±12	7
Man6-P	113±5	7,5	866±11	8

Datos obtenidos de la Fig. 17. Condiciones como las indicadas en la Fig. 17

(a) Concentración de efector para la que se logra la mitad de la activación máxima, expresada en mM

de  $Mg^{2+}$  libre desde 5 hasta 2,3 mM. Con objeto de establecer en qué medida la activación in vitro de la NR por G6P en presencia de  $Mg^{2+}$  es consecuencia de la disminución de la concentración efectiva de éste, se ensayó la actividad NR de hojas en luz y en oscuridad en presencia de las concentraciones de  $Mg^{2+}$  calculadas (*Tab. 14*) y se compararon con los valores obtenidos en la *Fig. 17-A*. En la *Fig. 18* se presentan las curvas de activación in vitro de la NR por G6P en un caso (*Fig. 18-A*) y por disminución de la concentración efectiva de  $Mg^{2+}$  en el otro (*Fig. 18-B*). Si la causa de la activación in vitro de la NR por G6P en presencia de  $Mg^{2+}$  fuese exclusivamente consecuencia de su capacidad quelante, se deberían obtener los mismos valores de actividad enzimática en ambos casos. Es evidente, que estas curvas de activación son diferentes, observándose una mayor activación en aquellas muestras que se ensayaron en presencia de G6P. Así, en condiciones de luz, la activación de la NR por disminución de la concentración de  $Mg^{2+}$  supuso sólo un 32% mientras que en presencia de G6P esta activación fue de un 112%. En condiciones de oscuridad, la activación en presencia de G6P fue, de un 850%, frente a la obtenida en su ausencia que fue de un 200% (*Fig. 18*). Estos datos indican que, la activación in vitro de la NR de hojas de cebada en luz y en oscuridad ejercida por la G6P, no se debe a su acción quelante de los iones  $Mg^{2+}$  y apuntan a una interacción directa de la G6P con el enzima, que además estaría disminuyendo la sensibilidad de la NR a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ .

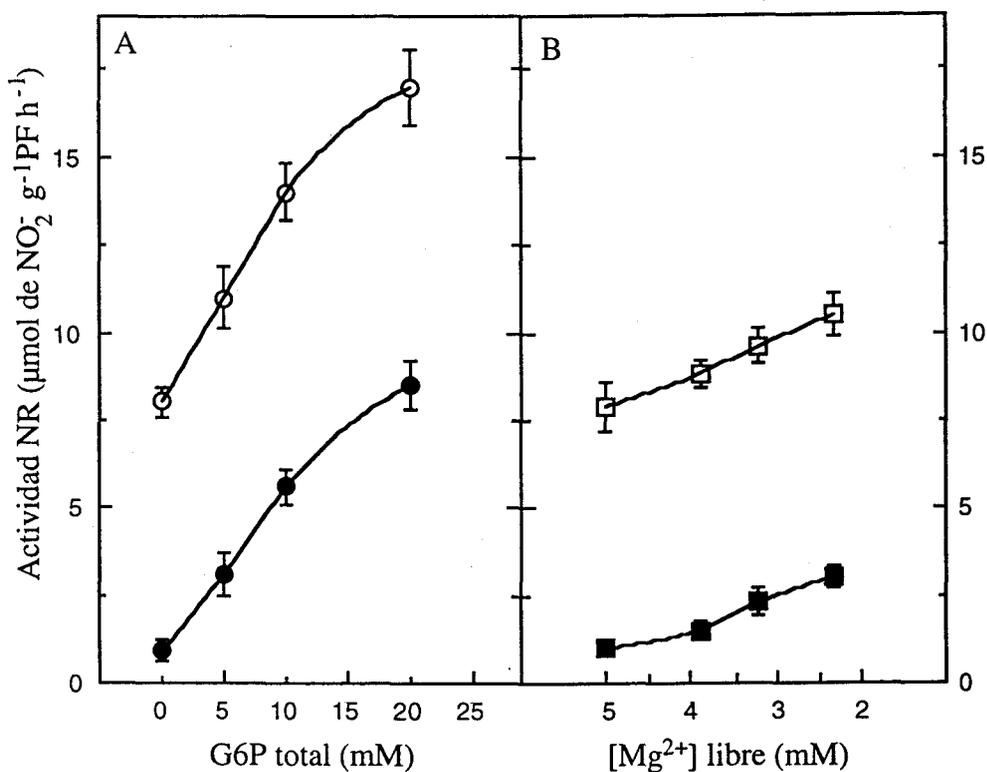
Para corroborar esta hipótesis, se ha determinado la actividad NR en extractos de hojas en oscuridad, ensayados en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de G6P, EDTA y  $Mg^{2+}$  que permitieron obtener diferentes concentraciones determinadas de  $Mg^{2+}$  libre en el medio de ensayo (apartado 2.3.3 de M. y M). En la *Fig. 19* se representan los resultados obtenidos. Es

**Tabla 14. Concentración de  $Mg^{2+}$  libre en ensayos realizados en presencia de  $Mg^{2+}$  5 mM y concentraciones variables de G6P.**

Efactor	Concentración (mM)			
G6P	0	5	10	20
$Mg^{2+}$ libre	5	3,9	3,2	2,3

Se muestran las concentraciones de  $Mg^{2+}$  libre presentes en cada una de las condiciones de ensayo de la Fig. 17-A.

**Fig 18.** *Comparación entre la activación de la NR por adición de G6P y por disminución de la concentración efectiva de  $Mg^{2+}$  libre en el medio*



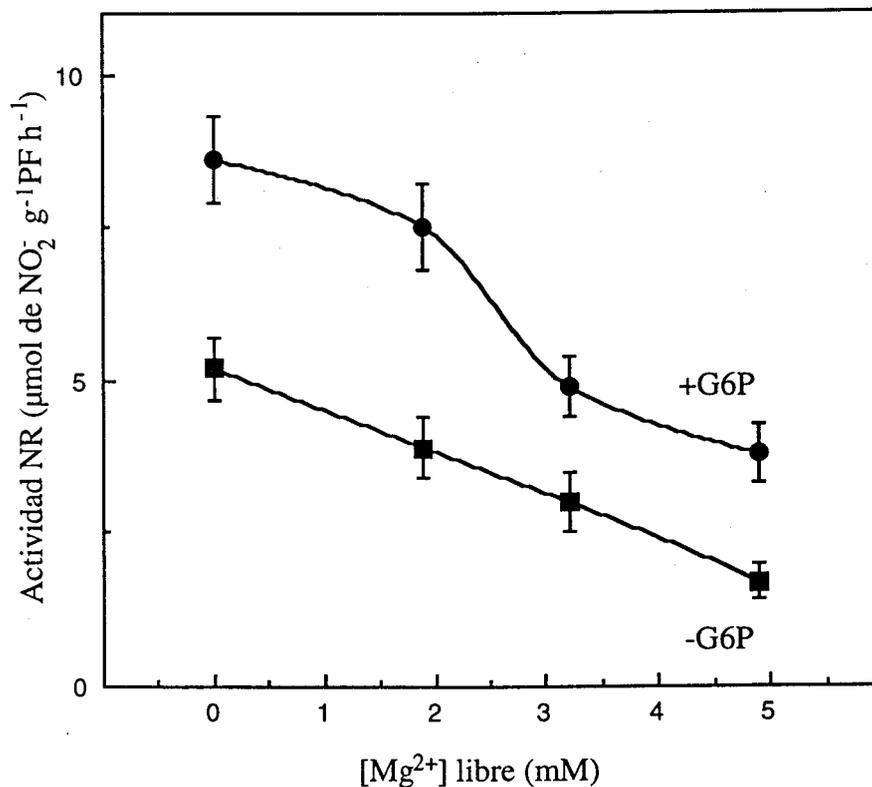
Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos en condiciones de cultivo (O, □) y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad (●, ■). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en  $N_2$  líquido. (A) Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3) conteniendo  $Mg^{2+}$  5 mM, la actividad NR se ensayó en este mismo medio a las concentraciones indicadas de G6P. (B) Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3), la actividad NR se ensayó en este mismo medio a las concentraciones indicadas de  $Mg^{2+}$  en cada caso. Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes.

evidente, que para cualquier concentración de  $Mg^{2+}$  libre, la actividad NR era significativamente más alta en presencia de G6P, con activaciones de un 65% en ausencia de  $Mg^{2+}$  y un 120% en presencia de  $Mg^{2+}$  libre 5 mM. Los datos indican nuevamente que la G6P tiene un efecto activador de la NR *per se*, independientemente del que pueda estar mediado por la disminución de la concentración efectiva de  $Mg^{2+}$  cuando ambos efectores coexisten en presencia del enzima.

Para corroborar nuestra hipótesis anterior sobre el efecto de la G6P por interacción directa con el enzima, por un lado se han completado los resultados que se presentan en la *Fig. 9*, ensayando la actividad NR de hojas en luz y en oscuridad en presencia y ausencia de G6P a concentraciones crecientes de  $Mg^{2+}$  (*Fig. 20*) y por otra parte se han representado conjuntamente los resultados de las *Figs. 13 y 17* donde se muestra el efecto activador de la G6P en presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$  (*Fig. 21*).

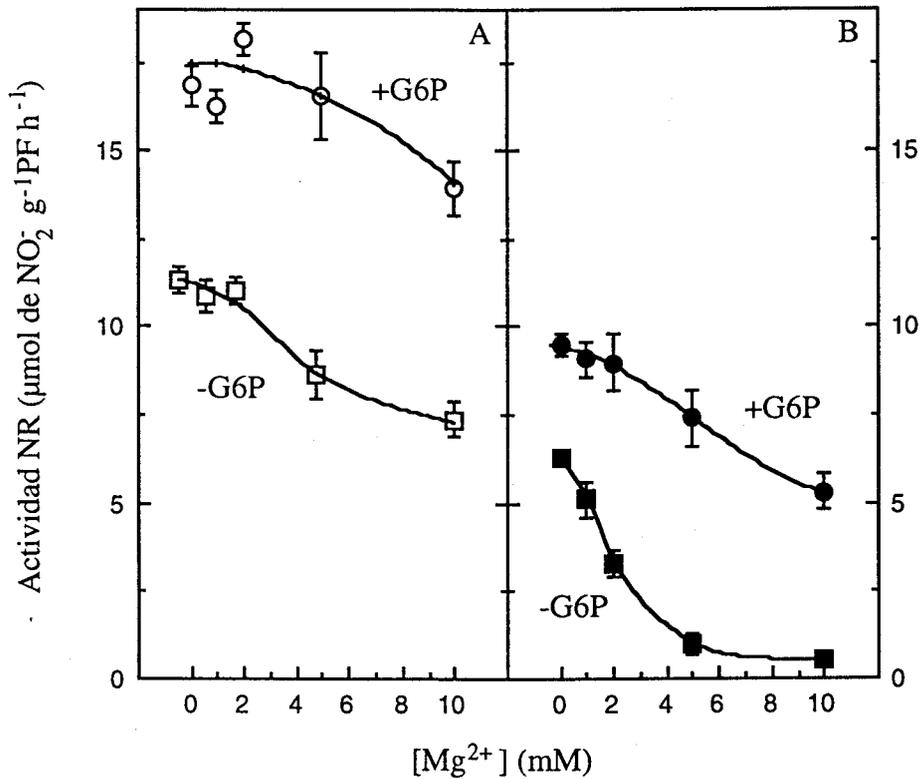
En la *Fig. 20* se representa la actividad NR en extractos de hojas en luz y en oscuridad en ausencia o en presencia de G6P 20 mM y a distintas concentraciones de  $Mg^{2+}$ . Como se describió en el apartado 3.2.1, en ausencia de G6P la NR de hojas en luz no se inhibió de forma significativa a concentraciones de  $Mg^{2+}$  inferiores a 2 mM. Fue necesaria la presencia de  $Mg^{2+}$  a concentraciones superiores a 5 mM para obtener inhibiciones significativas de la actividad NR, que alcanzaron valores de un 30 y 37% a concentraciones de 5 y 10 mM, respectivamente. Sin embargo en presencia de G6P, la inhibición *in vitro* por  $Mg^{2+}$  se dio únicamente a concentraciones superiores a 5 mM, siendo la inhibición máxima tan sólo un 18% a concentraciones del efector de 10 mM (*Fig. 20-A*). Por

**Fig 19.** *Sensibilidad a  $Mg^{2+}$ , en presencia y ausencia de G6P, de la actividad NR de hojas en oscuridad.*



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo y sometidas posteriormente a 30 min de oscuridad. Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en  $N_2$  líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3). La actividad NR se ensayó en el mismo medio, conteniendo las concentraciones de  $Mg^{2+}$ , G6P y EDTA indicadas en el apartado 2.3.3 de materiales y métodos. Se presenta la media  $\pm$ SE de, al menos, tres experimentos independientes.

**Fig 20.** *Sensibilidad a  $Mg^{2+}$  de la actividad NR de hojas de cebada en luz y en oscuridad ensayada en presencia o en ausencia de G6P.*

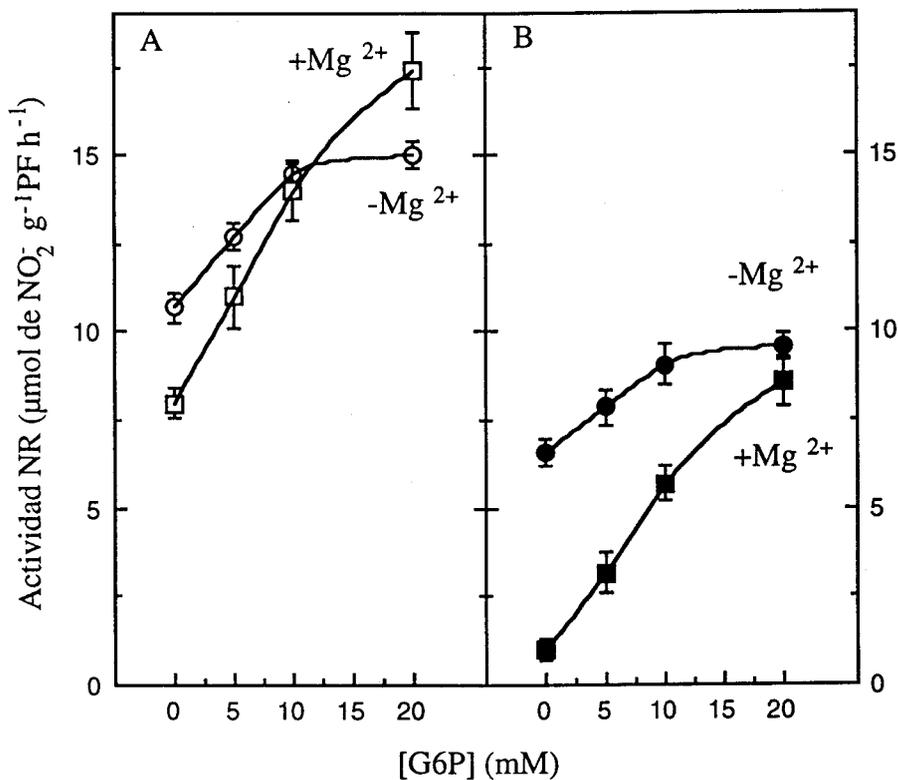


Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo (□, ○) y, en su caso, sometidas a continuación a 30 min de oscuridad (■, ●). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Los extractos se prepararon y desalaron en medio base (M. y M. apartado 2.3) a las concentraciones indicadas de Mg<sup>2+</sup>, y se ensayaron en este mismo medio en presencia (□, ■) o ausencia (○, ●) de G6P, 20 mM. Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos independientes. Los resultados representados con los símbolos □ y ■ corresponden a los resultados representados en la Fig 9.

tanto, la presencia de G6P disminuye la sensibilidad del enzima de iluminación a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ . Este efecto es más evidente para el enzima extraído de hojas en oscuridad (*Fig. 20-B*). En ausencia de G6P el enzima se inhibió de forma significativa incluso a concentraciones de  $Mg^{2+}$  de 1 mM, alcanzándose inhibiciones de un 50% y de prácticamente un 100% a concentraciones de 2 y 10 mM, respectivamente. Sin embargo en presencia de G6P el enzima de hojas en oscuridad fue insensible a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  hasta concentraciones de 2 mM y la máxima inhibición alcanzada fue de tan sólo un 44% a concentraciones de  $Mg^{2+}$  de 10 mM (*Fig. 20-B*). En conjunto, los datos indican que el efecto activador de la G6P sobre la NR debe producirse a dos niveles: en primer lugar, directamente sobre el enzima aumentando su eficiencia catalítica (*Tabls. 11 y 12*); y en segundo lugar disminuyendo la sensibilidad del enzima a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ .

Cabría esperar por tanto que una concentración suficientemente alta de G6P protegiese al enzima totalmente frente a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ . En la *Fig. 21-B* se observa que, como se había descrito anteriormente, en el caso de la NR extraída de hojas en oscuridad, la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  en ausencia de G6P es de un 86%. La presencia de G6P en el medio de ensayo disminuyó esta inhibición. Así, a concentraciones de 10 mM G6P la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  disminuyó hasta un 37% y no se llegaron a encontrar diferencias significativas entre la actividad NR en presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$ , a concentraciones de G6P 20 mM, lo que se correspondería con una prevención total frente a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ . Para la NR extraída de hojas en luz se encontraron resultados similares (*Fig. 21-A*). En este caso la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  fue de un 25% en ausencia de G6P. La presencia de G6P en el medio de ensayo disminuyó esta

**Fig 21.** *Activación in vitro por G6P de la NR de hojas de cebada en luz y en oscuridad, ensayada en presencia o en ausencia de Mg<sup>2+</sup>.*



Se representan los valores de activación in vitro por G6P de la NR extraída de hojas en luz (○, □) y en oscuridad (●, ■) ensayados en presencia (□, ■) o en ausencia (○, ●) de Mg<sup>2+</sup> 10 mM. Los datos se han calculado a partir de los resultados representados en las Figs. 9 y 13.

inhibición. A concentraciones de G6P 10 mM, se alcanzaron valores similares de actividad NR tanto en presencia como en ausencia del inhibidor, previniéndose por completo la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  (*Fig. 21-A*). Los datos indican un efecto competitivo entre la activación por G6P y la inhibición por  $Mg^{2+}$  del enzima de hojas en luz y en oscuridad. En estas condiciones experimentales la presencia de una concentración suficientemente alta de G6P en el medio protege completamente al enzima frente a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ , dicho de otro modo para una concentración suficientemente alta de G6P el  $Mg^{2+}$  no se une a la NR

Es evidente, por tanto, que la G6P y el  $Mg^{2+}$  compiten por su interacción con la NR para producir una forma más activa o inhibida de la misma. Los resultados muestran además, que a las concentraciones de efectores ensayadas, la G6P tiene capacidad para suprimir el efecto inhibidor del  $Mg^{2+}$ , mientras que el aumento de  $Mg^{2+}$  en los medios de ensayo no disminuye la capacidad de activación de la G6P.

### 3.2.4 Caracterización de la interacción de la NR con la G6P y con el Mg<sup>2+</sup>

De los estudios descritos en los apartados anteriores se deduce que el Mg<sup>2+</sup> actúa como efector negativo de la NR de hojas en luz o en oscuridad. La inhibición por Mg<sup>2+</sup> se manifiesta en una disminución de la  $V_{\max}$  y sobre todo en un fuerte descenso de la eficiencia catalítica del enzima, siendo esta inhibición significativamente mayor sobre la NR de oscuridad. Por otra parte los resultados indican que los azúcares-fosfato y concretamente la G6P son efectores positivos del enzima que ejercen una acción totalmente opuesta a la del Mg<sup>2+</sup>, es decir actúan principalmente sobre la NR de hojas en iluminación aumentando la  $V_{\max}$  y sobre todo su eficiencia catalítica. Además como efectores positivo y negativo, G6P y Mg<sup>2+</sup> compiten por su interacción con la NR.

En el modelo de regulación propuesto para la NR de hojas de espinaca el Mg<sup>2+</sup> también está implicado en la inhibición del enzima. En este modelo ejercería su acción como factor necesario en la unión de una proteína inhibidora a la NR previamente fosforilada (*Esquema 1*). En los estudios realizados por el grupo de Mackintosh sobre la propuesta anterior se recurrió al fraccionado con sulfato amónico de extractos de hojas de espinaca con objeto de aislar la proteína inhibidora de la actividad NR (Mackintosh et al., 1995). Por otra parte se han realizado estudios de separación y reconstitución del sistema en los que se ha utilizado una fracción de NR parcialmente purificada por cromatografía de afinidad (Mackintosh, 1992)

Con objeto de aclarar la posible interacción de la NR con el Mg<sup>2+</sup> y la G6P hemos utilizado la misma aproximación, en un caso fraccionando con sulfato

amónico extractos de hojas de cebada en luz y en oscuridad y en otro obteniendo fracciones parcialmente purificadas de NR mediante cromatografía de afinidad en azul sefarosa (apartado 2.4 de M. y M.)

Según los resultados de los fraccionados de extractos de hojas de espinaca descritos (Mackintosh, 1992; Spill y Kaiser, 1994; Glaab y Kaiser, 1995) la mayor parte de la actividad NR precipita a valores de saturación de sulfato amónico inferiores al 35% mientras que la fracción con actividad inhibidora lo hace por encima del 40%. Reproduciendo esta misma metodología en el caso de hojas de cebada los resultados fueron los que se muestran en la *Tab. 15*. En este caso todas las fracciones ensayadas en el rango entre 0 y 70% de saturación con sulfato amónico presentaron actividad NR, cualquiera que fueran las condiciones de iluminación. No obstante, siempre se obtuvo la mayor parte de la actividad NR en la fracción  $f_{30-70}$ , (entre el 60 y el 90% de la actividad total).

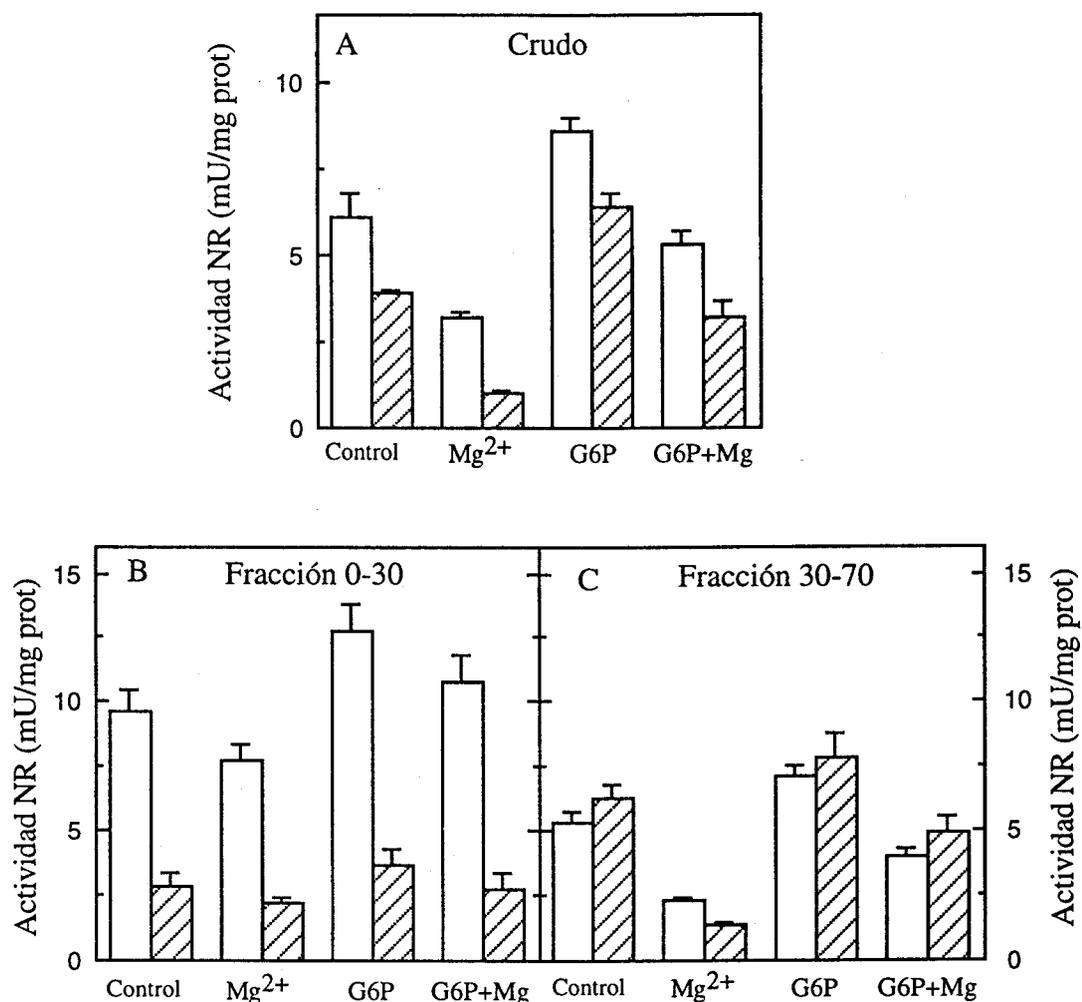
En la *Fig. 22-A*, se muestran los valores de actividad NR de los extractos crudos desalados de hojas en iluminación y en oscuridad, ensayados en presencia de  $Mg^{2+}$  y/o G6P. En estas condiciones, la actividad NR presentó las mismas características ya descritas a lo largo de este trabajo. Así, la inactivación in vivo por oscuridad era evidente en todos los casos, alcanzando valores de aproximadamente un 35% y 70% en ausencia y en presencia de  $Mg^{2+}$ , respectivamente. Por otra parte, y en consonancia con los resultados previamente descritos, se produjo la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  de la NR de hojas en iluminación y en oscuridad. Además, se observa la activación in vitro de la NR por G6P y también se pone de manifiesto la protección de la NR por G6P frente a la inhibición por  $Mg^{2+}$  (*Fig. 22-A*).

**Tabla 15. Actividad NR total de distintas fracciones obtenidas con SA de extractos de hojas de iluminación o de oscuridad.**

	Actividad NR (mU)	
	Luz	Oscuridad
Fracción $f_{0-30}$	187±6	40±10
Fracción $f_{30-70}$	310±28	374±10
Crudo desalado	609±30	404±40

Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo y en su caso tras 60 min de oscuridad. Tras el tratamiento las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Las distintas fracciones se obtuvieron como se indica en el apartado 2.5 de M. y M. La actividad NR se determinó en medio base. Se presenta la media ± SE de, al menos, tres experimentos independientes.

**Fig 22.** Efecto de la G6P y/o el  $Mg^{2+}$  sobre la actividad NR, en extractos crudos desalados y las fracciones de SA f0-30 y f30-70 obtenidos de hojas de cebada en luz y en oscuridad.



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo (□) y en su caso tras 60 min de oscuridad (▨). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en  $N_2$  líquido. Las distintas fracciones se obtuvieron como se indica en M. y M. apartado 2.5. La actividad NR se determinó en medios sin adiciones o que contenían  $Mg^{2+}$  10 mM y/o G6P 15 mM. Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes.

Como se describe en M. y M. (apartado 2.5), a partir de este extracto crudo se realizó el fraccionado con sulfato amónico. Los valores de actividad NR obtenidos en la fracción  $f_{0-30}$  se representan en la *Fig. 22-B*. Sorprendentemente en esta fracción, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad NR en presencia y ausencia de  $Mg^{2+}$  tanto con el enzima de hojas en iluminación como con el de oscuridad, lo que pone de manifiesto la insensibilidad del enzima presente en esta fracción a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ . Estos resultados concuerdan con los obtenidos en hojas de espinaca en los que la NR en la fracción 0-30% era insensible a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  lo que se interpretó en el sentido de que en esta fracción 0-30% no estaba presente la proteína inhibidora. Sin embargo en nuestro caso, la presencia de G6P en el medio de ensayo produjo la activación de la NR de hojas en iluminación y en oscuridad, tanto en presencia como en ausencia de  $Mg^{2+}$ , aunque con valores de activación inferiores a los obtenidos en los extractos crudos (*Fig. 22-B*).

En la *Fig. 22-C* se presentan los valores de actividad NR obtenidos en la fracción  $f_{30-70}$ . En este caso, si se detectó la inactivación in vitro por  $Mg^{2+}$  de la NR, que era de un 56 y un 77% para el enzima de hojas en iluminación y en oscuridad, respectivamente. Por otra parte, al igual que en la fracción  $f_{0-30}$ , se observaba el efecto activador de la G6P sobre la NR de hojas en iluminación y en oscuridad, ensayada tanto en presencia como en ausencia de  $Mg^{2+}$ , aunque con valores de activación inferiores a los obtenidos en los extractos crudos.

El conjunto de estos resultados muestra que es posible obtener, por fraccionamiento con sulfato amónico una fracción  $f_{0-30}$  en la que la NR no se inhibe in vitro por  $Mg^{2+}$  de forma significativa. Estos resultados se pueden

interpretar de acuerdo con el modelo propuesto para el enzima de espinaca, en el que la inhibición de la NR requiere la unión de una proteína inhibidora en presencia de  $Mg^{2+}$ . Nuestros resultados en hojas de cebada indican que la actividad NR presente en la fracción 0-30% también requeriría una proteína inhibidora para que tuviese lugar la inhibición por  $Mg^{2+}$ . Esta proteína precipitaría junto con parte de la actividad NR en la fracción  $f_{30-70}$ , donde sí es posible detectar el efecto inhibitor del  $Mg^{2+}$ . Por otro lado, en las dos fracciones ensayadas se observa la activación in vitro de la NR por G6P, lo que indica que, o bien este efecto activador se produce por interacción directa con el enzima, o indirectamente a través de factores presentes en las dos fracciones.

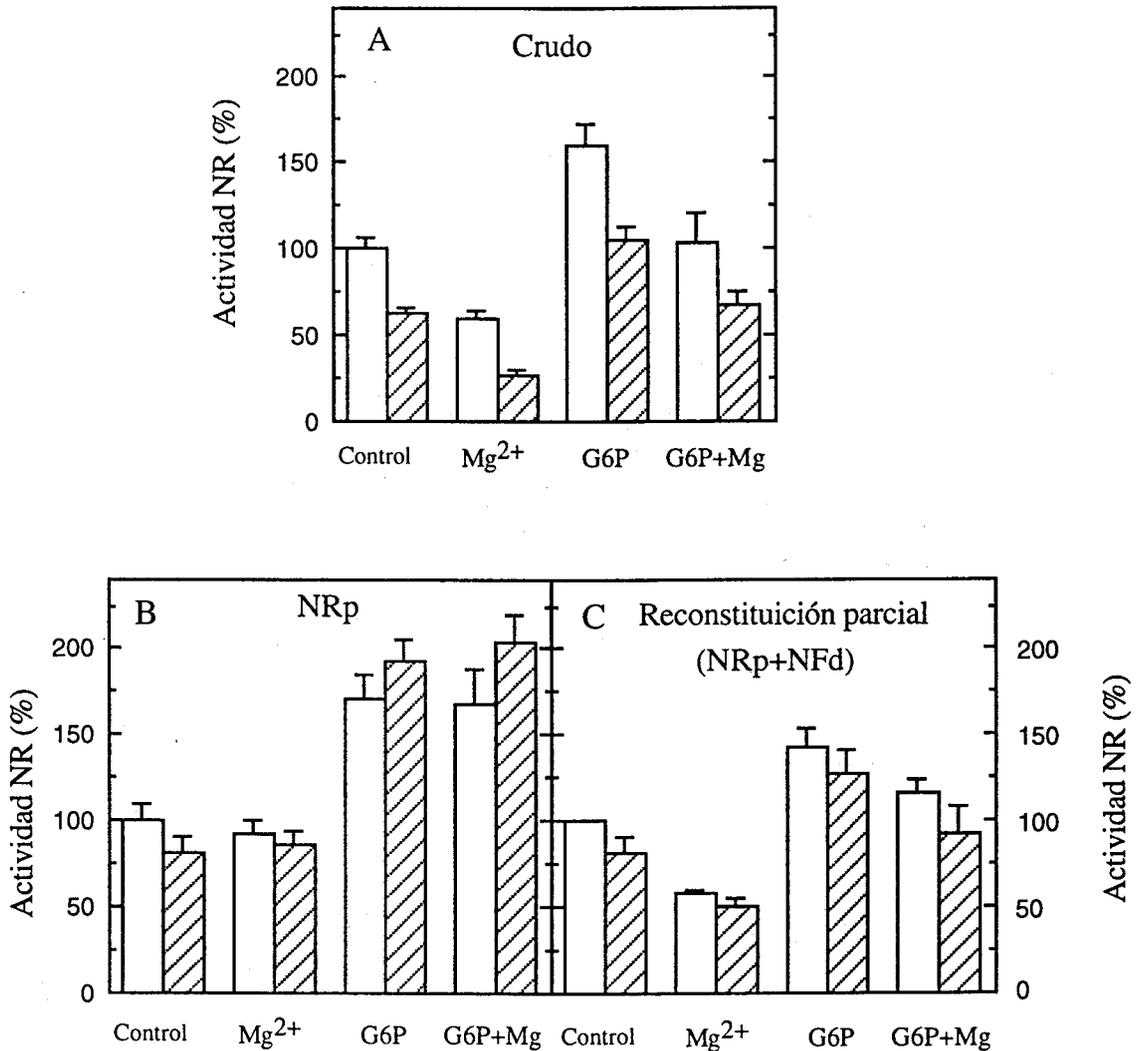
Puesto que mediante precipitación con sulfato amónico no es posible separar la actividad NR de otros factores implicados en el sistema, se obtuvo una única fracción con actividad NR por cromatografía de afinidad en azul-sefarosa de extractos crudos de hojas en iluminación o en oscuridad. Por este método se purificó rápidamente una fracción NR con una actividad específica de 700 mU/mg prot, unas 70 veces superior a la obtenida mediante fraccionamiento con sulfato amónico (apartado 2,5 de M. y M.).

La actividad NR determinada en el extracto crudo utilizado en la posterior cromatografía (*ECd*) presentó las características ya descritas a lo largo de este trabajo en cuanto a inactivación in vivo por oscuridad, sensibilidad a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  y activación por G6P (*Fig. 23-A*). Estos resultados aseguran que en el proceso de obtención de esta primera fracción no se alteran las características reguladoras de la NR de hojas de cebada.

En la fracción eluida de la columna de AS con NADH (*NRp*), se encontraron unas características reguladoras de la NR singulares (*Fig. 23-B*). En esta fracción, la actividad NR fue totalmente insensible a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ , tanto la del enzima procedente de hojas en iluminación como la del de oscuridad. Sin embargo, la G6P produjo un fuerte aumento de la actividad NR. Así, tanto en presencia como en ausencia de  $Mg^{2+}$ , la activación por G6P fue de aproximadamente un 90%, independientemente de las condiciones previas de iluminación. En conjunto, los datos ponen de manifiesto, en primer lugar, que la G6P actúa directamente sobre la NR o a lo sumo, a través de un factor que coeluye con ésta, y en segundo lugar, que el  $Mg^{2+}$  no actúa directamente sobre el enzima. Presumiblemente, y como indicaban los datos obtenidos de los fraccionados con sulfato amónico, este efecto inhibitor se establece a través de una proteína que no se encuentra en la fracción *NRp*.

Para analizar esta hipótesis, se determinó la actividad NR en la fracción *NRp* en presencia de la fracción no fijada a la columna de azul de sefarosa, (*NFd*) o de la fracción eluida con Na Cl (*NaCl*) y en ambos casos en presencia de  $Mg^{2+}$  y/o G6P (apartado 2.5 de M. y M.). No se observaron diferencias en la actividad NR de la fracción *NRp* cuando se ensayó en presencia de la fracción *NaCl* (datos no mostrados). Sin embargo como se muestra en la *Fig. 23-C* en presencia de la fracción *NFd* el enzima recuperó su sensibilidad a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ . En estas condiciones, tanto el enzima procedente de hojas en iluminación como en oscuridad, se inhibió por  $Mg^{2+}$  aproximadamente en un 63% (*Fig. 23-C*). Los resultados estarían en concordancia con el modelo de control propuesto para la NR foliar de otras especies, en el que la inhibición por  $Mg^{2+}$  del enzima sólo es posible por la unión de una proteína inhibidora. Estos resultados indicarían que

**Fig 23.** Efecto de la G6P y/o el  $Mg^{2+}$  sobre la actividad NR, en extractos crudos desalados y las fracciones de NR obtenidas por cromatografía de afinidad en azul-sefarosa de hojas de cebada en iluminación y en oscuridad.



Se utilizaron plantas de cebada iluminadas durante dos horas en condiciones de cultivo (□) y en su caso tras 60 min de oscuridad (▨). Tras el tratamiento, las hojas se congelaron en N<sub>2</sub> líquido. Las distintas fracciones se obtuvieron como se indica en M. y M. apartado 2.4. La actividad NR se determinó en medios sin adiciones o que contenían  $Mg^{2+}$  10 mM y/o G6P 15 mM. Se presenta la media  $\pm$  SE de, al menos, tres experimentos independientes. El 100% de la actividad NR corresponde a 11, 718, 4.8 mU  $\cdot$  mg<sup>-1</sup> proteína, para las fracciones crudo, NRp y NRp+NFD respectivamente

como se proponía anteriormente, el efecto inhibitor in vitro del  $Mg^{2+}$  sobre la NR, mediaría a través de un factor de alto peso molecular presente en los extractos y que no se fija a la matriz de azul sefarosa.

Por otra parte en este caso también se puso de manifiesto el efecto activador in vitro de la G6P (*Fig. 23-C*). El enzima se activó un 35% en ausencia de  $Mg^{2+}$  y aproximadamente un 50% en presencia del efector, tanto en condiciones de iluminación como de oscuridad.

Una vez obtenida la fracción con actividad NR, fracción *NRp*, y puesto que en los extractos crudos desalados, además de la G6P, otros azúcares-fosfato, ejercieron un efecto positivo sobre la actividad NR (*Figs. 13 y 17*), se determinó la actividad NR en esta fracción en presencia de diferentes azúcares o azúcares-fosfato. De todos ellos la G6P fue la que produjo una activación más evidente, que supuso un 46% en el caso de la NR de iluminación y un 60% en la de oscuridad (*Tab. 16*).

De los resultados se deduce que al igual que en el caso del enzima de otras especies el efecto inhibitor del  $Mg^{2+}$  sobre la NR de hojas de cebada cursa a través de un factor inhibitor. Además confirman nuestra hipótesis inicial en la que la G6P sería la señal que coordinaría la actividad NR con el estado de fijación de  $CO_2$  interactuando directamente con el enzima.

**Tabla 16. Efecto de diversos azúcares y azúcares-fofato sobre la actividad NR de la fracción “nitrato reductasa parcialmente purificada” (NRp).**

	Actividad NR (actividad específica %)	
	Luz	Oscuridad
Control	100	98
Mg <sup>2+</sup>	99	95
G6P	160	146
G1P	102	110
UDP-G	121	ND
DHAP	115	130
F6P	114	110
F2,6 diP	110	ND
F1,6 diP	110	ND
Glu	102	80

Se utilizaron plantas iluminadas durante 2 h en condiciones de cultivo y, en su caso, tras 60 min de oscuridad. La obtención de la fracción y la actividad NR se describe en el apartado 2.5 de materiales y métodos. Se presentan datos de un experimento representativo. El 100% de la actividad corresponde a 600 mU/mg prot

#### ***IV. DISCUSIÓN***

En los tejidos fotosintéticos de la planta, la regulación de la asimilación de nitrato es un aspecto clave para equilibrar la asimilación de los dos bioelementos primordiales, carbono y nitrógeno. La biosíntesis de aminoácidos, precursores para la síntesis de proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, etc, requiere esqueletos carbonados, procedentes de la fijación de  $\text{CO}_2$ , y nitrógeno amínico, procedente de la asimilación de nitrato. Es evidente que si operase la asimilación de nitrato en ausencia o deficiencia de fijación de  $\text{CO}_2$ , se produciría la acumulación en la célula de especies reducidas de nitrógeno inorgánico (nitrito o amonio) que producen citotoxicidad.

En microalgas existe una amplia evidencia experimental que indica el control por carbono de la asimilación de nitrato (Losada et al., 1981; Lara, 1992), aunque en estos organismos, dicho control se ejerce a nivel del transporte de nitrato al interior de la célula (Lara et al., 1993). En plantas superiores no existe por el momento evidencia de que el transporte de nitrato esté sometido a control metabólico. El trabajo pionero de Kaiser y Förster (1989) presenta, por el contrario, evidencia de que en plantas de espinaca sometidas a estrés hídrico, que provoca cierre estomático y la consiguiente inhibición de la fijación de  $\text{CO}_2$ , la reducción de nitrato en la hoja está drásticamente inhibida por inactivación de la NR y las hojas siguen acumulando activamente nitrato. Probablemente, la capacidad de almacenar nitrato transitoriamente en la vacuola haya determinado que el principal punto de control de la ruta en plantas sea el primer enzima de la misma, esto es, la NR.

Como se ha expuesto en la introducción (apartado 1.2), existe ya amplia evidencia de que la NR foliar de plantas superiores se inactiva de forma reversible al inhibir la fijación de  $\text{CO}_2$  al someter las hojas a cortos períodos de oscuridad. Se

ha puesto de manifiesto que en espinaca (Kaiser y Brendle-Benish, 1991; Kaiser y Spill, 1991), avena (Rouby et al., 1998), calabaza (Glaab y Kaiser, 1996) o guisante (Kaiser y Huber, 1994; Glaab y Kaiser, 1996), esta inactivación implica la fosforilación del enzima y su posterior unión, en presencia de  $Mg^{2+}$  a una proteína inhibidora de tipo 14-3-3 (Glaab y Kaiser, 1995; Mackintosh et al., 1995; Bachman et al., 1996a; Ferl, 1996; Huber et al., 1996; Moorhead et al., 1996; Sehnke y Ferl 1996).

Hasta la fecha, la naturaleza de la señal o señales implicadas en la regulación por luz y  $CO_2$  de la NR foliar de plantas superiores no se ha podido establecer con claridad. Inicialmente se propuso que los niveles citosólicos de ATP y AMP podrían determinar el estado de activación de la NR de hojas de espinaca (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992). Tal proposición ha sido discutida y finalmente descartada (Riens y Heldt, 1992; Kaiser y Huber, 1994; de Cires et al., 1993b). También se han propuesto otras posibles señales, como cambios del pH, de los niveles de  $Ca^{2+}$  del citosol (Bachmann et al., 1995) o de los niveles de ésteres fosfato (Bachman et al., 1995; McMichael et al., 1995), que pudieran coordinar el estado de activación de la NR con la fotosíntesis.

Los estudios sobre la modulación in vivo de la NR de hojas de cebada que se presentan en este trabajo, indican que los niveles de determinados productos de la fijación de  $CO_2$  podrían ser la señal reguladora implicada en la respuesta de la actividad NR a las condiciones de iluminación y de fijación de  $CO_2$  de la hoja. Las principales evidencias que sustentan esta propuesta son:

- 1) Tras someter las hojas a un corto período de oscuridad se producen la

inactivación de la NR y de forma más rápida, un descenso en los niveles de H6P (F6P + G6P). De igual forma tras reiluminar las hojas se observa una rápida recuperación de los niveles de H6P y la reactivación del enzima hasta valores similares a los iniciales (*Fig. 4*). Por otra parte cuando la reiluminación se lleva a cabo en ausencia de CO<sub>2</sub> la NR permanece inactiva y no se recuperan los niveles iniciales de H6P (*Fig. 7*)

2) En este mismo sentido, cuando se someten las hojas a una fase gaseosa carente de CO<sub>2</sub> se produce un rápido descenso de los niveles foliares de H6P y de forma simultanea la inactivación del enzima. Tras pasar de nuevo las hojas a condiciones de cultivo se recuperan los niveles control tanto de H6P como de actividad NR (*Fig. 8*).

3) En hojas incubadas en condiciones de alta fotosíntesis (5% de CO<sub>2</sub> y 1500  $\mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), se obtuvieron niveles de H6P y de actividad NR superiores a los obtenidos de hojas incubadas en condiciones de cultivo (aire y 350  $\mu\text{mol fotones} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (*Tab. 5*).

4) En plantas cultivadas en medios con más del 90% del nitrógeno total como amonio y una pequeña proporción de nitrato, suficiente para inducir niveles de expresión de la NR similares a los de plantas cultivadas con nitrato como única fuente de nitrógeno, la actividad NR foliar y los niveles de H6P en condiciones de iluminación son similares a los de plantas control en oscuridad (*Tabs. 6 y 7*). Estas condiciones hacen que la asimilación de nitrógeno tenga lugar principalmente en la raíz (Lewis et al., 1986), por lo que el déficit en los niveles de carbohidratos en la hoja como consecuencia

de su exportación masiva hacia la raíz sería responsable de la inactivación reversible de la NR foliar incluso en condiciones de iluminación y fijación activa de CO<sub>2</sub>.

5) Mediante el suministro de Glc, DHAP, G6P o F6P a través de la corriente de transpiración a hojas en iluminación se consigue un aumento en los niveles de H6P. Una vez sometidas estas hojas a un período de oscuridad los niveles de H6P siguen siendo superiores a los del control en iluminación, y la NR no se inactiva in vivo por oscuridad, (*Fig. 5*). El hecho de que esta protección se ponga de manifiesto incluso cuando los ensayos se llevan a cabo tras desalar los extractos indica que el efecto sobre la NR es debido a la acción in vivo de las H6P sobre el mecanismo de modulación de la actividad NR implicado en las transiciones luz-oscuridad (*Fig. 6*).

6) Cuando se inhibe la fijación de CO<sub>2</sub> mediante el suministro a la hoja de GA se consigue disminuir los niveles de H6P y paralelamente la inactivación de la NR en condiciones de iluminación (*Tab. 4*). Sin embargo si se suministran conjuntamente GA y G6P se produce una acumulación de H6P a pesar de la inhibición de la fijación de CO<sub>2</sub>, y en esta situación se previene la inactivación de la NR.

Es evidente por tanto que la regulación de la NR está mediada por los productos de la fijación de CO<sub>2</sub> y más concretamente por los niveles de H6P. Así mientras los niveles de H6P superaran un cierto umbral la NR foliar se encontraría en su forma activada. La propuesta más simple es que la G6P actúe como señal reguladora. Por ello condiciones de iluminación o que favorecen la fijación de

CO<sub>2</sub>, que darían lugar a elevados niveles de G6P en la hoja (*Figs. 4-8*), aseguran la activación del enzima. Condiciones de oscuridad o de inhibición de la fijación de CO<sub>2</sub>, que producen un rápido descenso de los niveles foliares de G6P, permiten la inactivación de la NR. Además, cuando se incrementan los niveles de G6P artificialmente, mediante el suministro de diferentes azúcares o azúcares-fosfato a la hoja, se produce un aumento de actividad NR mientras que la disminución de estos niveles provocada por el suministro de inhibidores de la fijación de CO<sub>2</sub> o por la exportación de carbohidratos de la hoja hacia la raíz tiene como consecuencia la inactivación del enzima.

Por ello, proponemos que los niveles citoplasmáticos de G6P serían la señal reguladora que coordina la actividad NR con la capacidad de fijación de CO<sub>2</sub> de la hoja. Sin embargo el mecanismo molecular a través del cual pudiera ejercerse este papel no puede ser desvelado a partir de los datos obtenidos en estas experiencias in vivo. En este sentido, en el caso de la NR de hojas de espinaca se ha propuesto que proteínas quinasas que fosforilan a la NR se inhiben por G6P (Bachman et al., 1995; McMichael et al., 1995). Hay que decir que aunque no existen evidencias que permitan extrapolar este mecanismo de modificación covalente reversible propuesto para la NR de espinaca a la NR de cebada, los resultados pueden interpretarse dentro de dicho modelo (Kaiser y Spill, 1991; Kaiser et al., 1992; Huber et al., 1992b). En el caso de hojas de cebada la G6P podría interaccionar directamente bien con la proteína quinasa inhibiendo de esta forma su actividad, bien con la NR para dar lugar a una forma menos sensible al mecanismo de inactivación.

Los estudios sobre modulación in vitro de la NR de hojas de cebada que se

describen en el apartado 3.2 aportan información relevante sobre este aspecto. Estos resultados permiten proponer que la NR de hojas de cebada se presenta en dos formas interconvertibles que presentan propiedades diferentes y a las que hemos denominado forma de luz ( $NR_{luz}$ ) y forma de oscuridad ( $NR_{osc}$ ). In vivo, la transición entre estas dos formas de NR se produce como consecuencia de cambios en las condiciones de iluminación (Su et al., 1996; Lillo et al., 1994; Lillo et al., 1997; de Cires et al., 1993a y b; Huber et al., 1992a y b; Kaiser et al., 1992; Kaiser y Huber 1994; Huber y Kaiser 1996; Merlo et al., 1995; Xiu y Oaks, 1995; Nussaume et al., 1995; Lejay et al., 1997; *Figs. 1, 2, 4-9, 11, 14, 17, 18, 20, 21*), la tasa de la fijación de  $CO_2$  (de Cires et al., 1993a; Kaiser y Foster, 1989; Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991; Fonseca et al., 1997; Ferrario et al., 1997; Lejay et al., 1997; *Fig. 8*) o en la fuente de nitrógeno utilizada por las plantas (*Tab. 6*).

Las diferencias más evidentes entre estas dos formas de NR se aprecian en los valores de  $V_{max}$ . El análisis cinético de la NR de hojas de cebada revela que la  $V_{max}$  de la forma de oscuridad del enzima es un 40% menor que la de la forma de iluminación, y esto es lo que permite que se observe la inactivación in vivo por oscuridad del enzima incluso en ausencia de  $Mg^{2+}$  (*Figs. 11 y 12; Tabs. 8 y 9*). Este mismo efecto se observa en muchos otros de los ensayos que se presentan en este trabajo y que se han llevado a cabo en condiciones saturantes de los dos sustratos del enzima ( $NO_3^-$  y NADH). En estos casos, la inactivación por oscuridad fue similar (*Figs. 2, 9, 10, 13 y 14*). Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que esta menor actividad de la  $NR_{osc}$  no sería una característica general del enzima. Así, al igual que le ocurre a la NR de hojas de cebada, la  $NR_{osc}$  de hojas de maíz, remolacha o guisante (de Cires, 1996) presenta

una  $V_{\max}$  inferior a la de la  $NR_{luz}$ ; mientras que no se observan estas diferencias en  $V_{\max}$  entre las formas del enzima de hojas de otras especies como acelga, calabacín, calabaza, espinaca, melón, pepino, tabaco o soja (de Cires, 1996).

Otro de los parámetros en el que se pone de manifiesto la diferencia entre las formas de luz y oscuridad de la NR de hojas de cebada es la  $K_m$  para el  $NO_3^-$ . Así la  $K_m$  para el  $NO_3^-$  de la NR de hojas de cebada en luz, es de  $60 \mu M$ , valor similar al obtenido para el enzima purificado de hojas en luz de diferentes especies (Guerrero et al., 1981; Campbell 1989; Dwivedi et al., 1994; Trimboli y Barber 1994; Ratnam et al., 1995; Barber et al., 1997; Lillo et al., 1997; Ratnam et al., 1997; Su et al., 1997). El enzima de hojas de cebada en oscuridad, sin embargo, presenta una  $K_m$  de  $24 \mu M$ . Esta diferencia de  $K_m$  para el  $NO_3^-$  entre la NR de hojas en luz y en oscuridad no se ha descrito para el enzima de otras especies. Así se han obtenido valores similares de  $K_m$  para el nitrato de la  $NR_{luz}$  o  $NR_{osc}$  de hojas de espinaca tanto en ensayos realizados a partir de extractos crudos (Kaiser y Brendle-Behnish, 1991) como en aquellos realizados a partir de la NR parcialmente purificada (Lillo et al., 1997). Por tanto las diferencias en  $K_m$  y  $V_{\max}$  entre la NR de hojas en iluminación o en oscuridad no serían una característica común a todas las especies estudiadas.

Según el modelo de regulación propuesto para el enzima de hojas de espinaca, la fosforilación reversible de la NR sería condición necesaria pero no suficiente para dar lugar a la inactivación del enzima, puesto que además se tendría que producir la unión a la proteína inhibidora en presencia de  $Mg^{2+}$ . En cebada, tal y como ponen de manifiesto los resultados que se presentan en este trabajo, en

condiciones de oscuridad, inhibición de la fijación de  $\text{CO}_2$  o induciendo el descenso en los niveles de fotosintato en la hoja se obtiene el enzima en su forma inactiva ( $\text{NR}_{osc}$ ), independientemente de la presencia o ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$ , e incluso al ensayar en presencia de agentes quelantes (M. y M. 2.3.2; *Fig. 2*). Por otra parte tanto la  $\text{NR}_{luz}$  como la  $\text{NR}_{osc}$  se inhiben in vitro en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (de Cires, 1993). Es evidente pues, que en la NR de hojas de cebada se pueden distinguir dos inhibiciones aditivas: una inactivación in vivo por oscuridad, independiente de  $\text{Mg}^{2+}$ , que da lugar a la forma inactiva del enzima ( $\text{NR}_{osc}$ ) y una inhibición in vitro por iones  $\text{Mg}^{2+}$  que se superpone a la anterior.

El estudio en profundidad de este efecto inhibitor de  $\text{Mg}^{2+}$  in vitro pone en evidencia un comportamiento diferente de las dos formas. Así para cualquiera de las concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  ensayadas se observa una mayor inhibición de la  $\text{NR}_{osc}$  que indica una mayor sensibilidad de esta forma de NR a la inhibición in vitro por  $\text{Mg}^{2+}$  (*Fig. 9*). Por otra parte otro grupo de resultados ponen también en evidencia esta distinta sensibilidad al  $\text{Mg}^{2+}$  entre las dos formas del enzima (*Figs. 11, 12, 22 y 23*). Sin embargo al comparar el grado de inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$ , en estos casos se observan diferencias que son atribuibles a las condiciones de extracción y ensayo y que indican como se discutirá más adelante que en la inhibición interviene además una proteína inhibidora cuya unión a la NR es más estable en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  (Lillo et al., 1997). Esta diferencia en la sensibilidad a la inhibición in vitro por  $\text{Mg}^{2+}$  de las dos formas de activación de la NR se ha descrito, además de en cebada (de Cires, 1996), en *Arabidopsis thaliana* (Su et al., 1996), calabaza (Agüera et al., 1999; Lillo et al., 1997; de Cires, 1996), espinaca (Kaiser y Brendle-Behnisch, 1991) y maíz (Merlo et al., 1995),

Por tanto concluimos que la NR se presenta en dos formas de activación ( $NR_{luz}$  y  $NR_{osc}$ ) que se distinguen por su  $V_{max}$ ,  $K_m$  y sensibilidad a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ . Si bien esta última diferencia podría ser una característica común de la NR foliar no se puede afirmar lo mismo en cuanto a las diferencias en  $K_m$  y  $V_{max}$ . Estos cambios en las propiedades de la NR foliar en respuesta a las condiciones de iluminación, la tasa de fijación de  $CO_2$  y la fuente de nitrógeno utilizada por las plantas, son estables en extractos desalados (Huber et al., 1992b; Huber et al., 1994; Kojima et al., 1994; LaBrie y Crawford, 1994; *Figs. 2, 9-18*), indicando la implicación de un mecanismo de modificación covalente.

En cebada además de disminuir los valores de  $V_{max}$  del enzima, la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  produce un fuerte descenso de la eficiencia catalítica, que es mucho más acusado en el caso de la  $NR_{osc}$  (*Tab. 8 y 9*). Por otra parte de los experimentos de reconstitución del sistema a partir de las fracciones obtenidas en la purificación parcial del enzima se deduce que la inhibición por  $Mg^{2+}$  de la NR de hojas de cebada requiere la interacción de un factor inhibidor (*Figs. 22 y 23*). En el caso del enzima de espinaca también ha sido descrita una proteína inhibidora implicada en la inhibición por  $Mg^{2+}$  (Spill y Kaiser, 1994; Glaab y Kaiser, 1995; Mackintosh et al., 1995) y que posteriormente ha sido identificada como una 14-3-3 (Bachman et al., 1996a; Ferl, 1996; Huber et al., 1996; Moorhead et al., 1996; Sehnke y Ferl, 1996).

El estudio in vitro del efecto de los azúcares-fosfato sobre las dos formas del enzima ha puesto de manifiesto que estos metabolitos actuarían uniéndose al enzima y modificando sus propiedades catalíticas (*Tab. 10*). Las principales características de la interacción de los azúcares-fosfato con la NR son las

siguientes:

1) Los azúcares-fosfato interaccionan con la  $NR_{luz}$  y la  $NR_{osc}$  produciendo un aumento de su actividad similar en ambas formas. Esta interacción no debe ser covalente puesto que su efecto desaparece al desalar los extractos. El estudio cinético de la acción de los azúcares-fosfato, utilizando como modelo la G6P pone de manifiesto que además de un aumento en la  $V_{max}$ , se produce un incremento de la eficiencia catalítica que es mayor en el caso de la  $NR_{luz}$  (*Tab. 11 y 12*).

2) El efecto activador in vitro de los azúcares-fosfato consiste en modificar las propiedades catalíticas de cada una de las formas de NR y no en promover la transición  $NR_{osc}$ - $NR_{luz}$ . Si en ello consistiera cabría esperar que a concentraciones saturantes no hubiesen diferencias de actividad NR, que además sería la máxima puesto que en este caso todo el enzima se encontraría en su forma  $NR_{luz}$ . Sin embargo tal y como se observa en la *Fig. 13* aparecen diferencias entre ambos estados de activación para cualquiera de los azúcares ensayados. Por otra parte en este caso la interacción de la NR con los azúcares-fosfato no es covalente como se requeriría para promover la transición entre ambas formas.

3) El hecho de que la activación por azúcares-fosfato se produzca también sobre la fracción NR parcialmente purificada por cromatografía en azul-sefarosa indica que no se requieren factores adicionales que intervienen en dicha interacción.

4) Un aspecto interesante de la interacción azúcar-fosfato - NR se deduce del hecho de que el único azúcar-fosfato activo sobre la fracción NR parcialmente purificada por cromatografía en azul-sefarosa sea la G6P. Esto indicaría una mayor

especificidad de la NR por la G6P frente al resto de los azúcares-fosfato.

5) Por otra parte los azúcares-fosfato protegen a la NR frente a la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$ . Cuando se analiza el modo de acción por el que la G6P produciría esta prevención es evidente que uno de los posibles mecanismos podría estar mediado por la capacidad quelante de éste azúcar (O'Sullivan y Smithers, 1979) que de esta forma disminuiría la concentración efectiva de  $Mg^{2+}$  en el medio de ensayo; sin embargo esto no es así, como se observa en las *Figs. 18 y 19* cuando se ensaya la actividad NR a las mismas concentraciones de  $Mg^{2+}$  libre en el medio y en presencia o en ausencia de G6P, en todos los casos la actividad NR es superior cuando los ensayos se llevan a cabo en presencia de G6P, indicando que es la interacción de la G6P con la NR la que evita la inhibición in vitro por  $Mg^{2+}$  del enzima. Además el aumento progresivo de la concentración de G6P disminuye la sensibilidad a la inhibición por  $Mg^{2+}$  de la NR, así concentraciones saturantes de G6P suprimen totalmente dicha inhibición. Esto permite proponer que como efectores la G6P y el  $Mg^{2+}$  compiten por su interacción con el enzima (*Fig. 20*). Esto explicaría las diferencias encontradas entre los distintos azúcares-fosfato ensayados en presencia de  $Mg^{2+}$ . Mientras que en ausencia del inhibidor cualquiera de ellos interacciona con la NR produciendo una activación similar del enzima (*Fig. 13*), cuando se establece la competencia con el  $Mg^{2+}$ , la G6P tiene un comportamiento más evidente que el resto de los azúcares ensayados (*Fig. 17*) lo que apoya nuestra hipótesis de una mayor especificidad del enzima por la G6P frente al resto de los azúcares ensayados.

Este conjunto de resultados pone de manifiesto la doble naturaleza del mecanismo de acción de la G6P sobre la NR;

1) Por una parte la interacción directa de la G6P con la NR en cualquiera de sus formas de activación produce una modificación de la actividad del enzima que se caracteriza principalmente por un fuerte aumento de la eficiencia catalítica, además esta interacción impediría la unión al enzima del factor inhibidor incluso en presencia de  $Mg^{2+}$ , evitando de esta forma la disminución de la eficiencia catalítica del enzima.

2) Por otra parte, in vivo el aumento de los niveles de azúcares-fosfato y más concretamente de G6P en las células inhibe el mecanismo de modificación covalente implicado en la transición hacia la forma  $NR_{osc}$ . Además en estas condiciones los altos niveles de G6P permiten la transición hacia la forma  $NR_{luz}$ .

El grupo de Huber (Bachman et al., 1995; McMichael et al., 1995) ha descrito que en un sistema reconstituido formado por NR y NIP parcialmente purificadas más una fracción a la que se atribuye actividad quinasa, la presencia de G6P en los ensayos reduce el porcentaje de inhibición por  $Mg^{2+}$  de la NR, lo que se ha interpretado en el sentido de que la G6P inhibe a la fracción con supuesta actividad quinasa. Sin embargo a la vista de nuestros resultados, el mecanismo de acción de la G6P no tendría que cursar necesariamente a través de la inhibición de una quinasa, ya que su interacción directa con la NR impediría la inactivación por fosforilación de la misma.

A otro nivel de regulación de la NR, se ha puesto de manifiesto en espinaca que cuando el enzima forma el complejo NR- $Mg^{2+}$ -NIP es más susceptible de ser degradado (Kaiser y Huber, 1997; Weiner y Kaiser, 1999). En este caso la G6P, que según nuestros resultados da lugar a la disociación de este complejo, intervendría

también a este nivel inhibiendo el proceso de degradación del enzima.

Así en condiciones de fijación activa de  $\text{CO}_2$  los niveles de azúcares-fosfato superarían un cierto umbral a partir del cual la NR se encontraría en su forma  $\text{NR}_{\text{luz}}$  interaccionando con la G6P, por lo que presentaría una eficiencia catalítica máxima. En esta situación la NR estaría protegida frente a la acción de las quinasas, evitando por tanto, su transición a la forma  $\text{NR}_{\text{osc}}$ . Ligeras modificaciones de esta situación darían lugar al correspondiente desplazamiento de los equilibrios, modulando así la actividad del enzima. Una vez que la fijación de  $\text{CO}_2$  disminuyese lo suficiente como para que los niveles de G6P se encontrasen por debajo de un determinado nivel crítico, la NR sería susceptible de ser fosforilada por la quinasa y pasar así a su forma  $\text{NR}_{\text{osc}}$ . En esta situación esta forma de la NR, con una alta sensibilidad a la inhibición por  $\text{Mg}^{2+}$  y en ausencia de G6P, se uniría al factor inhibidor disminuyendo drásticamente su eficiencia catalítica. Si la situación revirtiese, aumentando los niveles de azúcares-fosfato, el enzima pasaría de nuevo a su forma  $\text{NR}_{\text{luz}}$  y nos encontraríamos en el supuesto inicial, en caso contrario terminarían por desencadenarse los mecanismos implicados en la degradación de la NR.

## **V. CONCLUSIONES**

- 1.- Dependiendo de los niveles de hexosas 6-fosfato, la NR de hojas de cebada se presenta en dos formas que se distinguen por sus propiedades cinéticas y sensibilidad a la inhibición por  $Mg^{2+}$ . A altos niveles de hexosas 6-fosfato se obtiene una NR más activa con mayor  $V_{max}$  y mayor  $K_m$  para el nitrato y menor sensibilidad a  $Mg^{2+}$ . A bajos niveles de hexosas 6-fosfato se obtiene una NR menos activa con menor  $V_{max}$  y menor  $K_m$  para el nitrato y mayor sensibilidad al  $Mg^{2+}$ .
- 2.- De los estudios in vivo sobre la modulación de la actividad NR de hojas de cebada se deduce que los cambios en los niveles de hexosas 6-fosfato producidos por variaciones en las condiciones de fotosíntesis son la señal reguladora que coordina la actividad del enzima con la asimilación de carbono en la hoja. Estos cambios determinan la transición entre las dos formas del enzima.
- 3.- El  $Mg^{2+}$  es un efector negativo de la NR que disminuye la eficiencia catalítica de las dos formas del enzima aunque en mayor medida la de la forma menos activa. La acción del  $Mg^{2+}$  requiere la intervención de un factor proteico.
- 4.- La G6P actúa como efector positivo de la NR aumentando su eficiencia catalítica. Además compite con el  $Mg^{2+}$  por su interacción con el enzima, de forma que su unión al mismo impide el efecto inhibitor de este ion.

## ***VI. BIBLIOGRAFÍA***

- Aguera E, Poblete L, de la Haba P, Maldonado JM** (1999) Light modulation and in vitro effects of adenine nucleotides on leaf nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*). *Physiologia Plantarum* **105**: 218-223
- Andrews M** (1986) The partitioning of nitrate assimilation between roots and shoots of higher plants. *Plant Cell Environ.* **9**:511-519.
- Appenroth KJ, Meço R, Jourdan V, Lillo C** (2000) Phytochrome and post-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. *Plant Science* **159**: 51-56
- Aryan AP, Batt RG, Wallace W,** (1983) Reversible inactivation of nitrate reductase by NADH and the occurrence of partially inactive enzyme in wheat leaf. *Plant Physiol.* **71**: 582-587.
- Aslam M, Huffaker RC** (1989) Role of nitrate and nitrite in the induction of nitrite reductase in leaves of barley seedlings. *Plant Physiol.* **91**: 1152-1156.
- Aslam M, Huffaker RC, Rains W, Rao NP** (1979) Influence of light and ambient CO<sub>2</sub> concentration on nitrate assimilation by intact barley seedlings. *Plant Physiol.* **63**: 1205-1209.
- Aslam M, Rosichan JL, Huffaker RC** (1987) Comparative induction of nitrate reductase by nitrate and nitrite in barley leaves. *Plant Physiol.* **83**: 579-584.
- Aslam M, Travis RL, Huffaker RC,** (1992) Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley seedling. *Plant Physiol.* **99**: 1124-1133.
- Athwal GS, Huber JL, Huber SC** (1998a) Biological significance of divalent metal ion binding to 14-3-3 proteins in relationship to nitrate reductase inactivation. *Plant Cell Physiol.* **39**:1065-1072
- Athwal GS, Huber JL, Huber SC** (1998b) Phosphorylated nitrate reductase and 14-3-3 proteins. Site of interaction, effects of ions, and evidence for an AMP-binding site on 14-3-3 proteins. *Plant Physiol.* **118**: 1041-1048.
- Bachmann M, Huber JL, Athwal GS, Wu K, Ferl JR, Huber SC** (1996a) 14-3-3 proteins associate with the regulatory phosphorylation site of spinach leaf nitrate reductase in an isoform-specific manner and reduce dephosphorylation of Ser-543 by endogenous protein phosphatases. *FEBS letters* **398**: 26-30.
- Bachmann M, McMichael RJr, Huber JL, Kaiser WM, Huber SC** (1995) Partial purification

and characterization of a calcium-dependent protein kinase and inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Plant Physiol.* **108**: 1083-1091.

- Bachmann M, Shiraishi N, Campbell WH, Yoo BC, Harmon AC, Huber SC (1996b)** Identification of Ser-543 as the mayor regulatory phosphorylation site in spinach leaf nitrate reductase. *Plant Cell* **8**: 505-517
- Barber MJ, Trimboli AJ, Nomikos S, Smith ET (1997)** Direct electrochemistry of the flavin domain of assimilatory nitrate reductase: effects of NAD<sup>+</sup> and NAD<sup>+</sup> analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* **345**: 88-96.
- Beevers L, Hageman RH (1969)** Nitrate reduction in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol* **20**: 495-522.
- Beevers L, Hageman RH (1980)** Nitrate and nitrite reduction. En: *The Biochemistry of Plants*, vol. 5, B. J. Mifflin, ed. Academic Press, New York, pp. 115.
- Botrel A, Magne C, Kaiser WM (1996)** Nitrate reduction, nitrite reduction and ammonium assimilation in barley roots in response to anoxia. *Plant Physiol. Biochem.* **34**: 645-652.
- Bradford MM (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Budde RJ, Chollet R (1988)** Regulation of enzyme activity in plants by reversible phosphorylation. *Physiol. Plant* **72**: 435-439.
- Burns RC, Hardy RWF (1975)** Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer, Berlín.
- Campbell WH (1989)** Expression in *Escherichia coli* of cytochrome c reductase activity from maize NADH: nitrate reductase cDNA. *Plant Physiol.* **99**: 693-699.
- Campbell WH (1996)** Nitrate reductase biochemistry comes of age. *Plant Physiol.* **111**: 355-361.
- Campbell WH (1999)** Nitrate reductase structure, function and regulation: Bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **50**: 277-303.
- Campbell WH, Kinghorn JR (1990)** Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends Biochem. Sci.* **15**: 315-319.
- Crawford NM (1995)** Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell.* **7**: 859-868.
- Cheng C, Dewdney J, Kleinhofs A, Goodman HM (1986)** Cloning and nitrate induction of nitrate reductase mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 6825-6828.

- Dalling MJ, Tolbert NE, Hageman RH** (1972) Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase I. Spinach and tobacco leaves. *Biochim. Biophys. Acta* **283**: 505-512.
- Daniel-Vedèle F, Dorbe MF, Caboche M, Rouzé P** (1989) Cloning and analysis of nitrate reductase gene from tomato a comparison of nitrate reductase protein sequence in higher plants. *Gene* **85**: 371-380.
- Dawson HN, Burlingame R, Cannons AC** (1997) Stable transformation of *Clorella*: rescue of nitrate reductase-deficient mutants with the nitrate reductase gene. *Curr. Microbiol.* **35**: 356-362.
- Dawson RMC, Elliot DC, Elliot WH, Jones KM** (1969) *Data for Biochemical Research*. Oxford University Press, Oxford.
- de Cires A** (1996) *Modulación de la actividad nitrato reductasa de hojas de cebada*. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla, Sevilla.
- de Cires A, Torre A, Delgado B, Lara C**, (1993) Role of light and CO<sub>2</sub> fixation in the control of nitrate reductase activity in barley leaves. *Planta* **190**: 277-283.
- de Cires A, Torre A, Lara C**, (1993) Involvement of CO<sub>2</sub> fixation products in the light-dark modulation of nitrate reductase activity in barley leaves. *Physiol. Plant.* **89**: 577-581.
- Delieu TJ, Walker DA** (1983) Simultaneous measurements of oxygen evolution and chlorophyll fluorescence from leaf pieces. *Plant Physiol.* **73**: 534-541.
- Douglas P, Moorhead G, Morice N, Mackintosh C** (1998) Purification of a nitrate reductase kinase from *Spinacea oleracea* leaves, and its identification as a calmodulin-domain protein kinase. *Planta* **206**: 435-442.
- Douglas P, Morrice N, Mackintosh C** (1995) Identification of a regulatory phosphorylation site in the hinge 1 region of nitrate reductase from spinach *Spinacea oleracea* leaves. *FEBS Letters* **377**: 113-117.
- Douglas P, Pigaglio E, Ferrer A, Halford NG, Mackintosh C** (1997) Three spinach leaf nitrate reductase-3-hidroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinases that are regulated by reversible phosphorylation and/or Ca<sup>2+</sup> ions. *Biochem. J.* **325**: 101-109.
- Duggleby RG, Dennis DT** (1970) Nicotinamide adenine dinucleotide-specific isocitrate dehydrogenase from a higher plant. *J. Biol. Chem.* **245**: 3745-3750.
- Duke SH, Duke SO** (1984) Light control of extractable nitrate reductase activity in higher plants.

Physiol. Plant. **62**: 485-493.

**Dwivedi UN, Shiraishi N, Campbell WH** (1994) Identification of an "essential cysteine of nitrate reductase via mutagenesis of its recombinant cytochrome b reductase domain. *J. Biol. Chem.* **269**: 13785-13791.

**Echevarría C, Mauriño SG, Maldonado JM** (1984) Reversible inactivation of maize leaf nitrate reductase. *Phytochemistry* **23**: 2155-2158.

**Ferl RJ** (1996) 14-3-3 proteins and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.* **47**: 49-73.

**Ferrario-Mery S, Thibaud MC, Betsche T, Valadier MH, Foyer CH** (1997) Modulation of carbon and nitrogen metabolism, and of nitrate reductase, in untransformed and transformed *Nicotiana plumbaginifolia* during CO<sub>2</sub> enrichment of plants grown in pots and in hydroponic culture. *Planta* **202**: 510-521.

**Fonseca F, Bowsher CG, Stulen I** (1997) Impact of elevated atmospheric CO<sub>2</sub> on nitrate reductase transcription and activity in leaves and roots of *Plantago major*. *Physiol. Plant.* **100**: 940-948.

**Galangau F, Daniel-Vedele F, Maureaux T, Dorbe MF, Leydeker MT, Caboche M** (1988) Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to dark-light regimes and nitrate supply. *Plant Physiol.* **88**: 383-388.

**Gerhardt R, Stitt M, Heldt H** (1987) Subcellular metabolite levels in spinach leaves. *Plant Physiol.* **83**: 399-407.

**Glaab J, Kaiser WM** (1995) Inactivation of nitrate reductase involves NR-protein phosphorylation and subsequent "binding" of an inhibitor protein. *Planta* **195**: 514-518.

**Glaab J, Kaiser WM** (1996) The protein kinase, protein phosphatase and inhibitor protein of nitrate reductase are ubiquitous in higher plants and independent of nitrate reductase expression and turnover. *Planta* **199**: 57-63.

**Glass ADM, Siddiqi MY** (1995) Nitrogen absorption by plants. En: *Nitrogen Nutrition in Higher plants*, H. S. Srivastasa, R. P. Singh, eds. Associated Publishing Co., New Delhi, pp. 21-56.

**González C, Brito N, Marzluf GA** (1995) Functional analysis by site-directed mutagenesis of individual amino acid residues in the flavin domain of *Neurospora crassa* nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 456-464

- Guerrero MG, Vega JM, Losada M** (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**: 168-202
- Harel E, Lea PJ, Miflin BJ** (1977) The localization of enzymes of nitrogen assimilation in maize leaves and their activities during greening. *Planta* **134**: 195-200.
- Heat OVSI** (1977) *La Estadística en la investigación experimental*. Ediciones Omega S. A., Barcelona.
- Heldt HW** (1997) Nitrate assimilation. En *Plant biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, Oxford.
- Hewitt EJ** (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. 2<sup>nd</sup> ed. Tech. Commun. No. 22, Commonwealth Agricultural Bureaux of Hort., Farnham Royal, Maidstone.
- Hille R** (1996) The mononuclear molybdenum enzymes. *Chem. Rev.* **96**: 2757-2786.
- Huber SC, Bachmann M, Huber JL** (1996) Postranslational regulation of nitrate reductase activity a role for Ca<sup>2+</sup> and 14-3-3 proteins. *Trends Plant Sci.* **1**: 432-438.
- Huber SC, Huber JL** (1995) Metabolic activator of spinach leaf nitrate reductase: effects on enzymatic activity and dephosphorylation by endogenous phosphatases. *Planta* **196**: 180-189.
- Huber SC, Huber JL, Campbell WH, Redinbaugh** (1992a) Comparative studies of the light modulation of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase activities in spinach leaves. *Plant Physiol.* **100**: 706-712.
- Huber SC, Huber JL, Kaiser WM** (1994a) Differential response of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase-activation to inorganic and organic salts, in vitro and in situ. *Physiol. Plant.* **92**: 302-310.
- Huber JL, Huber SC, Wilbur H, Margaret G, Redinbaugh** (1992b) Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **296**: 58-65
- Huber SC, Kaiser WM** (1996) 5-Aminoimidazole-4-carboxamino riboside activates nitrate reductase in darkened spinach and pea leaves. *Physiol. Plant* **98**: 833-837.
- Huber JL, Redinbaugh MG, Huber SC, Campbell WH** (1994b) Regulation of maize leaf nitrate reductase activity involves both gene expression and protein phosphorylation. *Plant*

Physiol. **106**: 1667-1674

- Hwang CH, Yung L, D'Souza T, Cheng CH** (1997) Sequences necessary for nitrate dependent transcription of arabidopsis nitrate reductase genes. *Plant. Physiol.* **113**: 853-862.
- Ip Sm, Kerr J, Ingledeew WJ, Wray JL** (1990) Purification and characterization of barley leaf nitrite reductase. *Plant Sci.* **66**:155-165
- Kaiser WM, Brendle-Behnisch E** (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. I. Modulation in vivo by CO<sub>2</sub> availability. *Plant Physiol.* **96**: 363-367.
- Kaiser WM, Förster J** (1989) Low CO<sub>2</sub> prevents nitrate reduction in leaves. *Plant Physiol.* **91**: 970-974.
- Kaiser WM, Huber SC** (1994) Modulation of nitrate reductase in vivo: Effects of phosphoprotein phosphatase inhibitors, free Mg<sup>2+</sup> and 5'-AMP. *Planta* **193**: 358-364.
- Kaiser WM, Huber SC** (1997) Correlation between apparent activation state of nitrate reductase (NR), NR hysteresis and degradation of NR protein. *J. Exp. Bot.* **148**: 1367-1374
- Kaiser WM, Huber SC** (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Botany* **52**: 1981-1989
- Kaiser WM, Spill D** (1991) Rapid modulation of spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. II. In vitro modulation by ATP and AMP. *Plant Physiol.* **96**: 368-375.
- Kaiser WM, Spill D, Brendle-Behnisch E** (1992) Adenine nucleotides are apparently involved in the light-dark modulation of spinach-leaf nitrate reductase. *Planta* **186**: 236-240.
- Kamachi K, Amemiya Y, Ogura N, Nakagawa H** (1987) Immuno-gold localization of nitrate reductase in spinach *Spinacia oleracea* leaves. *Plant Cell Physiol.* **28**: 333-338.
- Kleinhofs A, Warner RL** (1992) Molecular analysis of nitrate metabolism. En: *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*, P R Shewry, ed. Commonwealth Agricultural Bureaux-International, Wallingford, pp. 209-229.
- Klepper L** (1990) Comparison between NO<sub>x</sub> evolution mechanisms of wild tipe and nar1 mutant soybean leaves. *Plant Physiol.* **93**: 26-32.
- Kuo T, Kleinhofs A, Warner RL** (1980) Purification and partial characterization of nitrate reductase from barley leaves. *Plant Sci. Lett.* **17**: 371-381.
- LaBrie ST, Crawford NM** (1994) A glycine to aspartic acid change in the MoCo domain of

- nitrate reductase reduces both activity and phosphorylation levels in *Arabidopsis*. J. Biol. Chem. 296: 14497-14501
- Lara C** (1992) Photosynthetic nitrate assimilation: Interacton with CO<sub>2</sub> fixation. En: Trends in photosynthesis research. (J Barber, M. G. Guerrero, H. Medrano, eds.), Intercept Ltd., Hampshire, pp. 195-208
- Lara C, Rodríguez R, Guerrero MG** (1993) Nitrate transport in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Physiol. Plant. 89: 582-587
- Larsson CM**, (1994) Responses of the nitrate uptake system to external nitrate availability: a whole plant perspective. En: A whole plant perspective on carbon-nitrogen interactions J Roy, E Garnier Eds. Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands : 31-45.
- Lea PJ, Blackwell RD, Joy KW** (1992) Ammonia assimilation in higher plants. En: Nitrogen Metabolism of Plants, K. Mengel, D.J. Pilbeam, eds. Oxford University Press, Oxford, pp. 153-186.
- Lea PJ, Mifflin BJ** (1974) An alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature 256: 614-616.
- Leegood RC, Furbank** (1986) Stimulation of photosynthesis by 2% oxygen at low temperatures is restored by phosphate. Planta 168: 84-93.
- Lejay L, Quilleré I, Roux Y, Tillard P, Cliquet JB, Meyer C, Morot-Gaudry JF, Gojon A** (1997) Abolition of posttranscriptional regulation of nitrate reductase partially prevents the decrease in leaf NO<sub>3</sub><sup>-</sup> reduction when photosynthesis is inhibited by CO<sub>2</sub> deprivation, but not in darkness. Plant Physiol. 115: 623-630.
- Lewis OAM, Fulton B, Zelewski AAA** (1987) Differential distribution of carbon in response to nitrate, ammonium and nitrate+ammonium nutrition in wheat. En: Inorganic Nitrogen Metabolism, P. J. Syrett, W. R. Ullrich, P. J. Aparicio, F. Castillo, eds. Spring-Verlang, New York, pp. 240-246.
- Lewis OAM, Soares MIN, Lips SH** (1986) A photosynthetic and <sup>15</sup>N investigation of the differential growth response of barley to nitrate, ammonium and nitrate-ammonium nutrition. En: Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants. H Lambeers, JJ Neeteson, I Stulen Eds. M Nijhoff Publ., Dordrecht, pp. 295-300
- Li XZ, Gesshoff PM** (1990) Developmental and biochemical regulation of constitutive nitrate reductase activity in leaves of nodulating soybean. J. Expt. Bot. 41: 1231-1236.

- Li XZ, Oaks A** (1993) Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. *Plant Physiol.* **106**: 1145-1149.
- Lillo C**, (1994) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiol. Plant.* **90**: 616-620.
- Lillo C, Kazazaic S, Ruoff P, Meyer C** (1997) Characterization of nitrate reductase from light- and dark-exposed leaves - Comparison of different species and effects of 14-3-3 inhibitor proteins. *Plant Physiol.* **114**: 1377-1383.
- Lin Y, Hwang CF, Brown JB, Cheng CL** (1994) 5' proximal regions of Arabidopsis nitrate reductase genes direct nitrate-induced transcription in transgenic tobacco. *Plant Physiol* **106**: 477-484.
- Long DM, Oaks A, Rothstein SJ** (1992) Regulation of maize root nitrate reductase mRNA levels. *Physiol. Plant.* **85**: 561-566.
- Losada M, Guerrero MG, Vega JM** (1981) The assimilatory reduction of nitrate. En: *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*, (H. Bothe, A. Trebst eds.) Springer, Berlin, pp. 30-36
- MacKintosh C** (1992) Regulation of spinach-leaf nitrate reductase by reversible phosphorylation. *Biochem. Biophys. Acta* **1137**: 121-126.
- MacKintosh C, Douglas P, Lillo C** (1995) Identification of a protein that inhibits the phosphorylated form of nitrate reductase from spinach *Spinacea oleracea* leaves. *Plant Physiol.* **107**: 451-457.
- MacKintosh C, Meek SEM** (2001) Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 205-214
- Maldonado JM, Notton BA, Hewitt EJ** (1980) The reactivation of nitrate reductase of spinach *Spinacea oleracea* L. inactivated by NADH and cyanide, using trivalent manganese either generated by illuminated chloroplasts or as manganipyrophosphate. *Planta*: **150**: 242-248.
- Mauriño SG, Vargas MA, Aparicio PJ, Maldonado JM** (1983) Blue-light reactivation of spinach nitrate reductase inactivated by acetylene or cyanide. Effects of flavins and oxygen. *Physiol. Plant.* **57**: 411-416.
- McClure PR, Kochian LV, Spanswick RM, Saff JE** (1990) Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. I. Effects of nitrate on the membrane potential. *Plant Physiol.* **93**: 281-289.

- McMichael RW, Bacmann M, Huber SC** (1995) Spinach leaf sucrose-phosphate synthase and nitrate reductase are phosphorylated/inactivated by multiple protein kinase in vitro. *Plant Physiol.* **108**: 1077-1082.
- Melzer JM, Kleinhofs A, Warner RL** (1989) Nitrate reductase regulation: effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. *Mol. Gen. Genet.* **217**: 341-346.
- Mendel RR** (1997) Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta* **203**: 399-405.
- Mendel RR, Muller AJ** (1976) A common genetic determinant of xanthine dehydrogenase and nitrate reductase in *Nicotiana tabacum*. *Biochemie and Physiologie der planzen* **170**: 538-541.
- Mendel RR, Muller AJ** (1979) Nitrate reductase-deficient mutant cell lines of *Nicotiana tabacum*. *Molecular and general genetics* **177**: 145-153.
- Merlo L, Ferretti M, Passera C, Ghisi R** (1995) Light-modulation of nitrate reductase activity in leaves and roots of maize. *Physiol. Plant.* **94**: 305-311.
- Moorhead G, Douglas P, Morrice N, Scarabel M, Aitken A, Mackintosh C** (1996) Phosphorylated nitrate reductase from spinach leaves is inhibited by 14-3-3 proteins and activated by fusicoccin. *Current Bio.* **6**: 1104-1113.
- Muller AJ, Grafe R** (1978) Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Molecular and General Genetics* **161**: 67-76.
- Nussaume L, Vicentz M, Meyer C, Boutin JP, Caboche M** (1995) Post-transcriptional regulation of nitrate reductase by light is abolished by a N-terminal deletion. *Plant Cell* **7**: 611-621.
- Oaks A** (1992) A re-evaluation of nitrogen assimilation in roots. *Bioscience* **42**: 103-111.
- Oji Y, Hamano T, Ryoma Y, Miki Y, Wakiuchi N, Okamoto S** (1985) Purification and characterization of NADH-nitrate reductase from leaves of 2-row barley, and its activity as affected by some metabolites. *J. Plant Physiol.* **119**: 247-256.
- Oostindier-Braaksma FJ, Feenstra WJ** (1973) Isolation and characterization of chlorate-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Mutation Research* **19**: 175-185.
- O'Sullivan WJ, Simithers** (1979) Stability constants for biologically important metal-ligand complexes. *Methods Enzymol.* **63**: 294-336

- Palacian E, De La Rosa F, Castillo F, Gómez-Moreno C** (1974) Nitrate reductase from *Spinacea oleracea*. Reversible inactivation by NADPH and by thiols. Arch. Biochem. Biophys. **161**: 441-447.
- Parker RE**, (1981) Estadística para Biólogos. Ediciones Omega S. A., Barcelona.
- Provan F, Lillo C** (1999) Photosynthetic post-translational activation of nitrate reductase. J. Plant Physiol. **154**: 605-609
- Quinn GB, Trimboli AJ, Barber MJ** (1994) Construction and expression of a flavocytochrome b<sub>5</sub> chimera. J. Bio. Chem. **269**: 13375-13381.
- Quinn GB, Trimboli AJ, Prosser IM, Barber MJ** (1996) Spectroscopic and kinetic properties of a recombinant form of the flavin domain of spinach NADH:nitrate reductase. Arch. Biochem. Biophys. **327**: 151-160.
- Ratnam K, Shiraishi N, Campbell WH, Hille R** (1995) Spectroscopic and kinetic characterization of the recombinant wild-type and C242S mutant of the cytochrome b reductase fragment of nitrate reductase. J. Biol Chem. **270**: 24067-24072.
- Ratnam K, Shiraishi N, Campbell WH, Hille R** (1997) Spectroscopic and kinetic characterization of the recombinant cytochrome c reductase fragment of nitrate reductase: identification of the rate limiting catalytic step. J. Bio. Chem. **272**: 2122-2128.
- Redinbaugh MG, Campbell WH** (1991) Quaternary structure and composition of squash NADH:nitrate reductase. J. Bio. Chem. **260**: 3380-3385.
- Riens B, Heldt HW** (1992) Decrease in nitrate reductase activity in spinach leaves during a light-dark transient. Plant Physiol. **98**: 573-577
- Roberts DM, Harmon AC** (1992) Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **43**: 375-414.
- Rockel P, Rockel A, Wildt J, Segschneider HJ** (1996) Nitric oxide (NO) emission by higher plants. En: Progress in Nitrogen Cyclin Studies. Van Cleemput et al. eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 603-606.
- Rodríguez-Sotes R, Muñoz-Clares RA** (1990) Kinetic evidence of the existence of a regulatory phosphoenolpyruvate binding site in maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Arch. Biochem. Biophys. **279**: 180-190
- Roldán JM, Romero F, López-Ruiz A, Díez J** (1987) Immunological approaches to inorganic

- nitrogen metabolism. En: Inorganic Nitrogen Metabolism, W R Ullrich, P J Aparicio, P J Syrett, F Castillo, eds. Spring-Verlang, Berlín, pp. 94-98.
- Rouby MB, González CA, Kenis JD (1998)** Substrates regulate the phosphorylation status of nitrate reductase. *Physiol. Plant.* **102**: 547-552.
- Rouze P, Caboche M (1992)** Nitrate reduction in higher plants: molecular approaches to function and regulation. En: Inducible Plants Proteins Wray JL ed., pp. 45-77
- Scheible WR, González-fontes A, Morcuende R, Lauerer M, Schulze ED, Caboche M, Stitt M (1997)** Accumulation of nitrate in the shoot acts as signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant. J.* **11**: 671-691.
- Schondorf T, Hachtel W (1995)** The choice of reducing substrate is altered by replacement of an alanine by a proline in the FAD domain of a bispecific NAD(P)H-nitrate reductase from birch. *Plant Physiol.* **108**: 203-210.
- Seeman JR, Berry JA, Freas SM, Krump MA (1985)** Regulation of ribulose bisphosphate carboxylase activity in vivo by a light-modulated inhibitor of catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8024-8028.
- Sehnke PC, Ferl RJ (1996)** Plant metabolism; enzyme regulation by 14-3-3 proteins. *Curr Biol.* **6**: 1403-1405.
- Shiraishi N, Campbell WH (1997)** Expression of nitrate reductase FAD-containing fragments in *Pichia*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 225-253.
- Sicher RC, (1984)** Glycolaldehyde inhibition of photosynthetic carbon assimilation by isolated chloroplasts and protoplasts. En: *Advances in Photosynthesis Research*, vol. 3, C. Sybesma, ed., M. Nijhoff/Dr W. Junk Publ., The Hage, pp. 3: 6413-6416.
- Siddiqi MY, Glass DM, Ruth TJ, Rufty TW (1990)** Studies of the uptake of nitrate in barley. I Kinetics of  $^{15}\text{NO}_3^-$  influx. *Plant Physiol.* **93**: 1426-1432.
- Snell FD, Snell CT (1949)** Colorimetric methods of analysis. 3<sup>rd</sup> ed. vol. 2, D Van Nostrand Company Inc., New Jersey, pp. 802-807.
- Solomonson LP, (1974)** Regulation of nitrate reductase activity by NADH and cyanide. *Biochem. Biophys. Acta* **334**: 297-308.
- Solomonson LP, Barber MJ (1990)** Assimilatory nitrate reductase: Functional properties and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 225-253.

- Solomonson LP, Vennesland B** (1972) Properties of nitrate reductase of *Chorella*. *Biochem Biophys. Acta* **75**: 276-278
- Spill D, Kaiser WM** (1994) Partial purification of two proteins 100 KDa and 67 KDa cooperating in the ATP-dependent inactivation of spinach leaf nitrate reductase. *Planta* **192**: 183-188.
- Storer AC, Cornish-Bowden A** (1976) Concentration of MgATP<sup>2-</sup> and other ions in solutions. Calculation of the true concentrations of species present in mixtures of associating ions. *Biochem J.* **159**: 1-5
- Su W, Huber SC, Crawford NM** (1996) Identification in vitro of a post-translational regulatory site in hinge 1, region of arabidopsis nitrate reductase. *The Plant Cell* **8**: 519-527.
- Su W, Mertens JA, Kanamary K, Campbell WH, Crawford NM** (1997) Analysis of wild-type and mutant plant nitrate reductase expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Plant Physiol.* **115**: 1135-1143.
- Sugden C, Donaghy PG, Halford NG, Hardie DG** (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylated and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiol.* **120**: 257-274
- Suzuky A, Oaks A, Jacquot JP, Vidal J, Gadal P** (1985) An electron transport system in maize roots for reactions of glutamine synthase and nitrite reductase. *Plant Physiol.* **78**: 374-378
- Trimboli AJ, Barber MJ** (1994) Assimilatory nitrate reductase; reduction and inhibition by NADH/NAD<sup>+</sup> analogs. *Arch, Biochem. Biophys.* **315**: 117- 126.
- Trimboli AJ, Quinn GB, Smith ET, Barber MJ** (1996) Thiol modification and site-directed mutagenesis of the flavin domain of spinach NADH:nitrate reductase. *Arch. Biochem. Biophys.* **331**: 117-126.
- Ullrich WR**, (1992) Transport of nitrate and ammonium through plant membranes. En: *Nitrogen Metabolism in Plants*, K. Mengel, D. J. Pilbeam, eds. Oxford University Press, Oxford, pp. 121-138.
- Vargas MA, Mauriño SG, Maldonado JM** (1987) Flavin-mediated photoinactivation of spinach leaf nitrate reductase involving superoxide radical and activating effect of hydrogen peroxide. *Photochem. Photobiol.* **1**: 195-201.

- Vaughn KC, Campbell WH (1988)** Immunogold localization of nitrate reductase in Maize leaves. *Plant Physiol* **88**: 1354-1357.
- Vennesland B, Jetschman K (1971)** The nitrate reductase of *Chlorella vulgaris*. *Biochem. Biophys. Acta* **227**: 544-577.
- Vincentz M, Moreaux T, Leydeke M, Vaucheret H, Caboche M (1993)** Regulation of nitrate reductase and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J.* **3**: 315-324.
- von Caemmerer S, Farquhar GD (1981)** Some relationships between the biochemistry of photosynthesis and the gas exchange of leaves. *Planta* **153**: 315-387
- Walker D,(1988)** The use of oxygen electrode and fluorescence probes in simple measurements of photosynthesis. University of Sheffield, Oxgraphics Ltd.,Sheffield
- Wallsgrave RM, Lea PJ, Mifflin BJ (1979)** Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiol.* **63**: 232-236.
- Ward MR, Grimes HD, Huffaker RC (1989)** Latent nitrate reductase activity is associated with the plasma membrane of corn root. *Planta* **177**: 470-485.
- Ward MR, Tischner R, Huffaker RC (1988)** Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedling. *Plant Physiol.* **88** 1141-1145.
- Warner RL, Kleinhofs A (1977)** Nitrate reductase-deficient mutants in barley. *Nature* **269**: 406-407.
- Weiner H, Kaiser WH (1999)** 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBBS Lett.* **445**: 75-78
- Wirtz W, Stitt M, Heldt HW ( 1982 )** Light activation of Calvin enzymes as measured in pea leaves. *FEBS Lett.* **142**: 223-226.
- Wray J (1989)** Molecular and genetic aspects of nitrate reduction in higher plants. En: *Molecular and Genetic Aspects of Nitrate Assimilation* J Wray, J Kinghorn, eds. Oxford, pp. 244-262.
- Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, Dodson CG, Soneji Y (1995)** Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signaling pathways. *nature* **376**: 188-191.
- Xiu ZL, Oaks A (1995)** The effect of light on the nitrate and nitrite reductases in *Zea mays*. *Plant*

Sci. **109**: 115-118.

**Yamasaki H, Sakihama Y (2000)** Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* **468**: 89-92

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

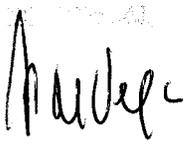
Después de haber sido leído por los señores firmantes en el día de la fecha, para fijar la tesis doctoral de

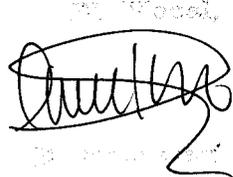
MIGUEL BOZA BARCENAS

sobre CONTROL POSTRADUCCIONAL DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA DE HOJAS DE CEBADA

se le otorga la calificación de SOBRESALIENTE cum laude por unanimidad.

Caracas, 15 de Abril de 2002

El Vocal,  


El Vocal,  


El Vocal,  
E. O. Hernández  
El Doctorado,



E. Martínez 