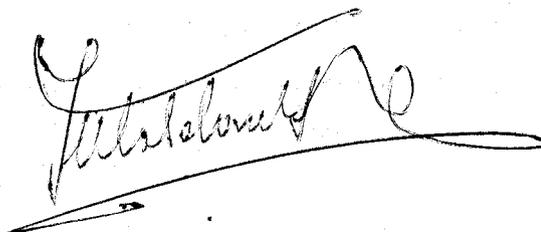


REGULACION DE LA ACTIVIDAD DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA  
DE Chlorella fusca

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA CIENCIAS  
23-7-74  
ENTRADA N.º 253

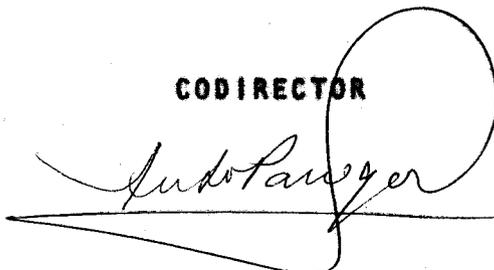
Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias <sup>(Biologicas)</sup>  
por el Licenciado D. JOSE M<sup>º</sup> MALDONADO RUIZ



Sevilla, Septiembre de 1974

DIRECTOR Y PONENTE

CODIRECTOR



Prof. Manuel Losada Villasante  
Catedrático de Bioquímica

Prof. Antonio Paneque Guerrero  
Profesor de Investigación del CSIC

R. 18576



Doy mi autorización a la Biblioteca de esta Facultad para que mi Tesis Doctoral

Regulación de la actividad del complejo  
NAADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca

Sea consultada, según la modalidad/es indicadas:

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

Firmado:

José M.<sup>a</sup> Maldonado Ruiz

Sevilla, a 24 de mayo de 2007

**A mis padres**

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección del Profesor Manuel Losada Villasante, Director del citado Departamento y Catedrático de Bioquímica.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Prof. M. Losada Villasante y al Prof. A. Paneque Guerrero, Codirector de este trabajo, así como al Dr. J. Herrera, quienes con su dedicación y estímulo han sabido inculcarme su gran entusiasmo por la Ciencia. Sus útiles enseñanzas y constante dirección han hecho posible la realización de esta Tesis.

Al doctor J.M. Vega, quien, junto con el doctor J. Herrera consiguieron iniciarme en las tareas investigadoras, les agradezco su interés y colaboración.

Mi agradecimiento así mismo, a los doctores P.J. Aparicio, J. Cárdenas, M. García-Guerrero, C. Gómez-Moreno, E. Palacián y J. Rivas y a mis compañeros J. López Barea, M<sup>a</sup> C. Pueyo, M<sup>a</sup> Tortolero, A. Chaparro, F. Castillo, F.F. de la Rosa, F.M. Sosa, J.M. Roldán, J. Moreno, A. Jiménez,

a I. Fernández por su eficaz ayuda y labor crítica. Mi sincera gratitud a la Srta. M<sup>te</sup> J. Pérez de León y a las Sras. A. Friend de Losada, M<sup>te</sup> I. Carretero e I. Sánchez por la confección de esta Tesis y por la realización de las gráficas y fotografías.

Por último, quiero agradecer su apoyo económico y material a las siguientes instituciones: Universidad de Sevilla, Ministerio de Educación y Ciencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Junta de Energía Nuclear, Philips Research Laboratories y Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica de la Presidencia del Gobierno, Fondo Nacional para el Desarrollo de la Investigación Científica.

## INDICE

Abreviaturas .....	10
I. <u>INTRODUCCION</u> .....	12
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u> .....	37
1. CULTIVO DE LAS CELULAS .....	38
1.1. Material y medio de cultivo .....	38
1.2. Condiciones especiales de cultivo .....	40
1.3. Medida del crecimiento .....	40
2. ENZINAS .....	41
2.1. Preparación de los extractos libres de células .....	41
2.2. Purificación parcial de la nitrato reductasa .....	42
2.2.1. Tratamiento con sulfato de estreptomina .....	42
2.2.2. Precipitación con sulfato amónico ..	42
2.3. Ensayo de actividades enzimáticas .....	43
2.3.1. Determinación de la actividad NADH-nitrato reductasa .....	43
2.3.2. Determinación de la actividad $\text{PHE}_2^-$ -nitrato reductasa .....	44
2.3.3. Determinación de la actividad NADH-diaforasa .....	44

3. METODOS ANALITICOS .....	46
3.1. Determinación de nítrito .....	46
3.2. Determinación de amoniaco .....	46
3.3. Determinación de protefna .....	46
3.4. Determinaciones espectrofotométricas .....	47
3.5. Determinación de pH .....	47
4. REACTIVOS .....	49
4.1. Procedencia de los productos químicos .....	49
III. <u>RESULTADOS</u> .....	50
1. REGULACION DE LA ACTIVIDAD FNH <sub>2</sub> -NITRATO REDUCTASA DEL COMPLEJO ENZIMATICO NADH-NITRATO REDUCTASA DE <u>Chlorella fusca</u> .....	51
1.1. Interconversión <u>in vitro</u> entre las formas ac- tiva e inactiva de la nítrato reductasa de <u>Chlorella</u> .....	51
1.1.1. <i>Inactivación reversible por los pirí- dín-nucleótidos reducidos</i> .....	51
1.1.2. <i>Reactivación por ferriolnuro de una preparación de nítrato reductasa inac- tiva carente de actividad diaforasíca.</i>	54
1.1.3. <i>Reactivación por 2,6-diclorofenol indo fenol</i> .....	57
1.2. Regulación <u>in vivo</u> de la actividad de la ní- trato reductasa de <u>Chlorella</u> .....	57
1.2.1. <i>Inactivación reversible de la nítrato reductasa por el amoniaco</i> .....	57

1.2.2.	<i>Inactivación reversible de la nitrato- reductasa por el arseniato</i> .....	59
1.2.3.	<i>Inactivación reversible de la nitrato reductasa por la metilamina</i> .....	62
1.2.4.	<i>Protección por menadiona contra la inactivación por amoniaco de la ni- trato reductasa</i> .....	67
1.2.5.	<i>Protección por menadiona contra la inactivación por arseniato de la nitra- to reductasa</i> .....	67
1.2.6.	<i>Protección por menadiona contra la inactivación por metilamina de la ni- trato reductasa</i> .....	70
1.2.7.	<i>Reactivación <u>in vivo</u> de la nitrato re- ductasa en presencia de menadiona</i> ....	70
1.2.8.	<i>Requerimiento de luz para la inactiva- ción por amoniaco o metilamina de la nitrato reductasa</i> .....	73
1.2.9.	<i>Inactivación reversible de la nitrato reductasa por anaerobiosis</i> .....	76
1.3.	<i>Regulación <u>in vitro</u> de la actividad de la ni- trato reductasa de <u>Chlorella</u></i> .....	79
1.3.1.	<i>Efecto de diferentes nucleótidos sobre la inactivación de la nitrato reducta- sa</i> .....	79
1.3.2.	<i>Inactivación reversible de la nitrato reductasa por la acción conjunta de NADH y ADP</i> .....	81

1.3.3.	<i>Protección por nitrato y diferentes inhibidores competitivos de la nitrato reductasa contra su inactivación por NADH y ADP</i> .....	85
1.3.4.	<i>Efecto de la concentración de ADP sobre la inactivación de la nitrato reductasa por NADH y ADP</i> .....	88
1.3.5.	<i>Efecto protector de diversos nucleótidos contra la inactivación de la nitrato reductasa por NADH</i> .....	90
2.	<b>REGULACION DE LA ACTIVIDAD NADH-DIAFORASA DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE <u>Chlorella fusca</u></b> .	92
2.1.	<b>Inactivación de la diaforasa por tratamiento térmico</b> .....	92
2.1.1.	<i>Protección por diversos coenzimas contra la inactivación a 252C y 452C</i> ...	92
2.1.2.	<i>Efecto de distintos inhibidores competitivos respecto al nitrato</i> .....	95
2.1.3.	<i>Cinética de la protección de la NADH-diaforasa por NADH y por ADP</i> .....	97
2.1.4.	<i>Efecto de diferentes concentraciones de NADH</i> .....	99
2.1.5.	<i>Efecto de diferentes concentraciones de NAD<sup>+</sup></i> .....	102
2.1.6.	<i>Efecto de diferentes concentraciones de ADP</i> .....	102

2.1.7. Reactivación por NADH de la actividad diaforásica .....	102
2.1.8. Efecto del FAD y NADH contra la inactivación de la NADH-diaforasa a diferentes temperaturas .....	105
2.2. Inactivación de la NADH-diaforasa por p-hi - droximercuribenzoato .....	108
2.2.1. Efecto de diversos sustratos y coenzimas .....	108
IV. <u>DISCUSION</u> .....	110
V. <u>CONCLUSIONES</u> .....	133
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	138

Abreviaturas

<b>A</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>ADP</b>	<b>Difosfato de adenosina</b>
<b>AMP</b>	<b>Monofosfato de adenosina</b>
<b>ATP</b>	<b>Trifosfato de adenosina</b>
<b>CDP</b>	<b>Difosfato de citidina</b>
<b>DPIP</b>	<b>2,6-diclorofenol indofenol</b>
<b>EDTA</b>	<b>Acido etiléndiaminotetracético</b>
<b>FAD</b>	<b>Flavín-adenín-dinucleótido</b>
<b>FMN</b>	<b>Flavín-mononucleótido</b>
<b>FNH<sub>2</sub></b>	<b>Flavín-nucleótido reducido</b>
<b>g</b>	<b>Aceleración de la gravedad</b>
<b>GDP</b>	<b>Difosfato de guanosina</b>
<b>NAD<sup>+</sup></b>	<b>Nicotinamida-adenín-dinucleótido</b>
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido</b>
<b>NADP<sup>+</sup></b>	<b>Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato</b>
<b>NADPH</b>	<b>Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato reducido</b>
<b>-NO<sub>3</sub> Raza</b>	<b>Nitrato reductasa</b>
<b>p-CMB</b>	<b>para-cloromercuribenzoato</b>
<b>p-HMB</b>	<b>para-hidroxiomercuribenzoato</b>

<b>p-MB</b>	<b>p-CMB ó p-HMB Indistintamente</b>
<b>Tris</b>	<b>Tri-(hidroximetil)-aminometano</b>
<b>UDP</b>	<b>Difosfato de uridina</b>
<b>XMP</b>	<b>Monofosfato de xantosina</b>

**I. INTRODUCCION**

### La asimilación fotosintética del nitrato

Los elementos biogénicos primordiales que, en forma inorgánica, absorben las plantas de su medio ambiente para sintetizar su propia materia están, en general, completamente oxidados: el carbono, como anhídrido carbónico; el nitrógeno, como nitrato, y el azufre, como sulfato. Por tanto, los organismos fotosintéticos -tanto las algas como las plantas superiores- tienen, en primer lugar, que reducirlos a un nivel directamente asimilable, utilizando para ello el único reductor disponible -el agua- y valiéndose de la única fuente de energía de que también disponen -la luz solar-.

Una vez reducidos, los elementos biogénicos son asimilados -también fotosintéticamente- y pasan a constituir el material vegetal, en el que aparecen, ya en forma orgánica, en estado de oxido-reducción variable: el carbono a un nivel cuyo promedio puede representarse simplíficadamente como  $(CH_2O)$ ; el nitrógeno a nivel amoniacal  $(NH_3)$ , y el azufre a nivel de sulfuro de hidrógeno  $(SH_2)$ .

La Fotosíntesis consta en esencia de dos fases:

1) la fase luminosa, que consiste en la conversión de la energía física contenida en los cuantos de luz -captados por los pigmentos clorofílicos y auxiliares- en energía química fisiológica, y 2) la fase oscura, que consiste en la reducción de los elementos biogénicos primordiales y en su posterior asimilación.

Las reacciones luminosas de la Fotosíntesis han sido fundamentalmente esclarecidas por ARNON y su grupo (1), e incluyen no sólo la síntesis de enlaces de fosfato ricos en energía -proceso en que el fosfato inorgánico se esterifica en forma orgánica, y que se conoce también como fotofosforilación- sino la fotólisis del agua en sus dos elementos integrantes (hidrógeno y oxígeno). ATP y poder reductor son, según ARNON (1), los productos finales de la Fotosíntesis propiamente dicha, constituyendo ambos el poder asimilatorio disponible para la reducción -y posterior asimilación- del anhídrido carbónico, nitrato y sulfato.

Respecto a la asimilación del nitrato por las plantas, su amplia y profunda significación biológica ra-

dica pues no sólo en el hecho de que el nitrógeno nítrico sea la principal fuente de este elemento que utilizan dichos organismos para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, sino también en que su reducción a amoníaco y su posterior asimilación estén estrechamente relacionados con las reacciones fotosintéticas propiamente dichas.

Después de largas controversias, ha quedado últimamente bien establecido (2) que la reducción asimilatoria del nitrato a amoníaco ocurra -tanto en bacterias, como en hongos, algas y plantas superiores- en sólo dos pasos sucesivos. El primer paso, reducción de nitrato a nitrito, supone un cambio en el número de oxidación del átomo de nitrógeno de +5 a +3 y está catalizado por la nitrato reductasa, que realiza la transferencia de dos electrones desde el piridín-nucleótido reducido hasta el nitrato. El segundo paso, la reducción del nitrito a amoníaco, está catalizado por la nitrito reductasa, que transfiere 6 electrones, y lleva consigo un cambio en el número de oxidación del átomo de nitrógeno de +3 a -3. En ninguna fase del proceso, se requieren compuestos de carbono ó ATP. En el presente trabajo hemos dedicado nuestra aten -

ción solamente a la nitrato reductasa, el primer enzima de los dos que constituyen el sistema reductor de nitrato.

### La nitrato reductasa del alga verde *Chlorella fusca*

La nitrato reductasa de Chlorella es un complejo enzimático que requiere específicamente NADH como donador fisiológico de electrones para la reducción del nitrato a nitrito. En la transferencia de electrones del NADH al nitrato participan secuencialmente dos actividades enzimáticas que pueden estudiarse separadamente. La primera es una NADH-diaforasa dependiente de FAD, que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la segunda porción del complejo, o bien a ciertos aceptores de electrones como son el citocromo c, el ferricianuro ó el 2,6-diclorofenol indofenol (3,4,5). La segunda mitad del complejo, FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa ó nitrato reductasa terminal, contiene molibdeno y puede utilizar como donador de electrones para la reducción de nitrato la porción diaforásica reducida por NADH, o bien flavín-nucleótidos o viológenos reducidos (6).

Debido a que no se ha logrado todavía purificar totalmente el complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella fusca, se ignoran bastantes datos acerca de su estructura. No obstante, su peso molecular ha sido determinado por filtración en columna de gel de agarosa (7), resultando ser de 500.000. Idéntico valor ha arrojado el enzima del alga Chlamydomonas reinhardtii (8) y el de espinaca (9). Otros autores han dado valores similares (500.000 - 600.000) para el enzima de hojas de trigo (10), y valores submúltiplos para enzimas de variados orígenes: 230.000 para el de Neurospora crassa (11) y 160.000 para el de maíz (10), lo que sugiere que el complejo enzimático tenga carácter oligomérico con distintos grados de agregación.

El grupo de NASON (12,13,14), mediante experimentos en los que utilizaron de forma paralela técnicas bioquímicas y genéticas de complementación in vitro, ha puesto de manifiesto que la NADPH-nitrato reductasa de Neurospora crassa es un heteromultímero formado por, al menos, dos subunidades distintas codificadas por cistrones diferentes. Una de estas subunidades, de peso molecular

50.000, es de naturaleza inducible y parece ser la NADPH-diaforasa. El segundo componente,  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa, es una subunidad constitutiva, que se presenta en forma inactiva, a menos que esté combinada con la subunidad NADPH-diaforasa.

Si estos resultados fueran extrapolables al complejo NADH-nitrato reductasa de algas y plantas verdes, resultaría que este complejo estaría constituido, al menos, por dos subunidades, cada una de ellas con actividad enzimática diferente.

Las dos actividades (NADH-diaforasa y  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa) del complejo enzimático NADH-nitrato reductasa, tanto de algas como de plantas superiores, se afectan de manera diferente por tratamientos e inhibidores selectivos, y pueden protegerse específicamente contra la inactivación, e incluso reactivarse, por la acción de sus propios sustratos o de compuestos análogos.

La NADH-diaforasa es especialmente sensible a la inactivación por el reactivo de grupos sulfhidrílicos p-MB (15). La pérdida de su actividad va acompañada de la inac-

tivación de la NADH-nitrato reductasa; la segunda actividad del complejo puede también inactivarse por *p*-MB, pero es mucho menos sensible a este reactivo que la diaforasa, y por ello su inactivación requiere concentraciones mucho más altas (16). Se han encontrado efectos semejantes sobre la nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii (17) y de espinaca (18-21). Estos resultados sugieren la existencia de grupos sulfhidrilos, especialmente en la mitad diaforásica del complejo, necesarios para la actividad enzimática. El NADH, sustrato fisiológico del enzima, protege a la nitrato reductasa de Chlorella (15) y espinaca (21), y el FAD sólo a la de espinaca (21), contra la inactivación por los reactivos de grupos sulfhidrilos.

La mitad diaforásica también es sensible al tratamiento térmico. En efecto, el calentamiento a 45°C durante 5 minutos del enzima de Chlorella, inactiva completamente la NADH-diaforasa sin afectar a la FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa (5). Idéntica sensibilidad a este tratamiento exhiben la NADH-diaforasa de espinaca (6,21) y de Chlamydomonas reinhardi (22,23), lo cual da lugar a la pérdida de la capacidad de reducción del nitrato por el NADH cata

lizada por el complejo enzimático en conjunto (6). La inactivación por el calor de la mitad diaforásica del complejo NADH-nitrato reductasa puede prevenirse si el tratamiento se efectúa en presencia de concentraciones muy pequeñas (10  $\mu$ M) de FAD (5,23).

La segunda mitad del complejo enzimático, es decir, la FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa, se inhibe por agentes quelantes de metales, especialmente cianuro, azida y carbamilo-fosfato. Esta inhibición es de tipo competitivo respecto al nitrato, tanto para el enzima de Chlorella (15) como para el de espinaca (21).

VEGA y col. (15) observaron que el efecto inhibitor del cianuro sobre la nitrato reductasa de Chlorella era mucho más drástico cuando el enzima se encontraba en estado reducido por la adición previa del donador fisiológico NADH. Esta inhibición no se eliminaba al pasar el enzima por Sephadex G-25, a diferencia de lo que ocurría cuando el enzima se había incubado sólo con cianuro. Sin embargo, la actividad enzimática se restauraba añadiendo

el agente oxidante ferricianuro, lo que parece indicar que la afinidad del enzima por el cianuro depende del estado de reducción en que se encuentre la protefna.

El fenómeno de la inactivación de la nitrato reductasa por reducción y su carácter reversible constituye en la actualidad uno de los aspectos más fascinantes de la regulación del metabolismo del nitrógeno, que será analizado, en detalle, más adelante.

Experimentos llevados a cabo en nuestro Departamento han puesto de manifiesto que el molibdeno es un componente de la nitrato reductasa de Chlorella y que dicho metal es necesario para que la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa presente actividad (24,25). El volframio puede sustituir al molibdeno, pero el enzima con volframio incorporado carece de actividad NADH-nitrato reductasa, aunque su actividad diaforásica no se afecta en absoluto por este metal (26). La esencialidad del molibdeno para la reducción de nitrato ha sido también puesta de manifiesto en bacterias (27), hongos (11,28,29) y plantas superiores (30-33).

### Control metabólico de la nitrato reductasa

El metabolismo de cualquier organismo vivo está constituido por un gran número de reacciones interconectadas, cuya función es la de extraer del medio que le rodea la materia y la energía necesarias para mantener su compleja organización, así como para crecer y desarrollarse.

Todos los sistemas biológicos han desarrollado métodos de control que aseguren su constancia y estabilidad interna, buscando sobre todo dos puntos esenciales: disponer de una gran flexibilidad en su adaptación a las condiciones ambientales y procurar la mayor economía posible tanto de energía como de materiales. El control de las actividades de un organismo vivo puede alcanzar una gran complejidad, pero, en último término, se traduce en un control o regulación de su metabolismo. Esta regulación metabólica se puede conseguir controlando cada una de las múltiples reacciones que integran el metabolismo. Como cada una de dichas reacciones se encuentra catalizada específicamente por un enzima, el control por la célula de sus propios enzimas supone un control enormemente específico de

las reacciones que estos catalizan. Cada una de las etapas metabólicas constituye de este modo un centro potencial de control. Disponiendo de esta posibilidad, la célula puede controlar su metabolismo, de forma muy específica, en todas y cada una de sus partes, según interese en cada momento. De aquí se deduce que la regulación enzimática es la de mayor significado y contribución a la regulación metabólica, la cual es a su vez la base del control de los sistemas biológicos.

En general, el control de una reacción enzimática se puede ejercer por *regulación del nivel del enzima* que la cataliza. El aumento o la disminución de las cantidades de enzima presentes en un determinado momento acelerará o frenará la reacción enzimática. Este tipo de control, que comprende los procesos designados como *inducción y represión enzimáticas*, afecta a los mecanismos de síntesis de proteínas.

Puesto que los cambios en la concentración de enzimas tardan horas en producirse, los sistemas biológicos han desarrollado además otro mecanismo de regulación,

mucho más rápido y de efecto más drástico, consistente en modificar la actividad catalítica de los enzimas, es decir, en la *regulación de la actividad enzimática*. Estos dos tipos de control actúan en muchos casos conjuntamente, superponiendo sus efectos, con lo cual la respuesta a los cambios de las condiciones ambientales es mucho más rápida y completa. La regulación de la actividad enzimática se puede ejercer controlando la disponibilidad de los sustratos y cofactores específicos, ó bien mediante *enzimas reguladores*. Estos enzimas reguladores ocupan lugares claves en las rutas metabólicas, generalmente al inicio o en los puntos de ramificación, constituyendo centros de control metabólico.

Dentro de los enzimas reguladores tienen gran importancia los *enzimas alostéricos*, que presentan como característica particular el que su actividad se modifica al unirseles por fuerzas débiles (nunca covalentes) determinadas moléculas reguladoras, denominadas efectores o moduladores. Poseen más de una cadena polipeptídica y exhiben cinética de tipo sigmoidal en vez de la clásica hiperbólica de Michaelis-Menten.

Otro tipo de regulación enzimática, que cada vez adquiere mayor importancia, consiste en la modificación covalente del enzima regulador. Este tipo de control se conoce con el nombre de *interconversión enzimática* (34,35). Los enzimas interconvertibles existen en dos formas moleculares distintas con propiedades catalíticas diferentes: una activa y otra inactiva ó poco activa. La interconversión entre las dos formas del enzima tiene lugar por modificación química de la proteína, y lleva consigo la formación o ruptura de un enlace covalente y la adición o eliminación de un grupo específico. Las modificaciones químicas que, con mas frecuencia, ocurren en los enzimas interconvertibles son la fosforilación, adenilación, ADP-ribosilación y oxidación de grupos tiólicos. Es importante resaltar que la modificación producida por el efector sobre la proteína se mantiene aún después de la ausencia de aquél y que únicamente la acumulación de otro efector que estimule la reacción inversa restaura la actividad original. En cambio, en los enzimas alostéricos la modulación de la actividad es estrictamente dependiente de la presencia del efector correspondiente.

### *Regulación de la síntesis de la nitrato reductasa*

La regulación de la síntesis del primer enzima de la ruta catalizada por el sistema reductor de nitrato, es decir, la nitrato reductasa, ha sido objeto de numerosos estudios por diversos investigadores (36), habiéndose llegado en algunos casos a conclusiones contradictorias, sobre todo en lo que a plantas superiores se refiere (37), sobre el carácter inducible o represible de dicho enzima.

SYRETT y MORRIS (38) encontraron que la asimilación de nitrato por Chlorella vulgaris cesaba completamente cuando se añadían pequeñas concentraciones de amoníaco y volvía a comenzar cuando el amoníaco había sido asimilado. Los mismos autores establecieron posteriormente (39) que la formación de nitrato reductasa en Chlorella vulgaris se reprime por amoníaco.

LOSADA y col. (40) demostraron también que los dos enzimas del sistema reductor de nitrato de Chlorella fusca, es decir, la nitrato reductasa y la nítrito reductasa, están sujetos a represión nutricional por el amoníaco.

co más bien que a inducción por el nitrato.

El carácter represible por amoníaco y no inducible por nitrato de la nitrato reductasa ha sido también puesto de manifiesto posteriormente en el alga verde Chlamydomonas reinhardi (41) y en la levadura Torulopsis nitrato-phila (42).

#### *Regulación de la actividad de la nitrato reductasa*

El mecanismo de la regulación de la actividad de la nitrato reductasa ha sido, y es en la actualidad, uno de los aspectos más debatidos e interesantes no sólo del metabolismo del nitrógeno nitrato sino de la regulación metabólica en general.

En trabajos previos realizados en nuestro Departamento se había puesto de manifiesto que la adición de amoníaco a un cultivo de células de Chlorella fusca (40, 43) o de Chlamydomonas reinhardi (41) creciendo en la luz con nitrato determinaba la rápida inactivación de la segunda mitad (FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa) del complejo NADH-ni

trato reductasa sin afectar a la actividad NADH-diaforasa. La posterior eliminación del amoníaco del medio conduce, de forma igualmente rápida, a la reactivación del enzima inactivo.

La nitrato reductasa de Chlamydomonas inactivada in vivo por amoníaco puede ser inmediatamente reactivada in vitro por oxidación a 0°C con ferricianuro. Bajo las mismas condiciones, el nitrato causa también la reactivación del enzima inactivado in vivo, pero a una velocidad más lenta (41). Posteriormente LOSADA y col. (44) han puesto de manifiesto que la nitrato reductasa de este alga se inactiva in vivo por tratamientos que provocan la acumulación de poder reductor dentro de la célula y, en consecuencia, la reducción del enzima.

La conversión in vitro de la forma activa de la nitrato reductasa de Chlamydomonas en la forma inactiva depende de su reducción por NADH. La transformación es reversible, y el enzima inactivado in vitro se vuelve de nuevo rápidamente activo después de su reoxidación con ferricianuro (41,44).

Usando una preparación parcialmente purificada de nitrato reductasa de Chlorella fusca en su forma activa se ha demostrado (45) que la inactivación por NADH de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa requiere que la NADH-diafo-rasa sea activa, y que la velocidad de inactivación aumenta con el pH. La forma activa del enzima se puede también inactivar de forma reversible por tioles simples y por sulfito (46,47).

RIGANO ha estudiado la nitrato reductasa del alga acidófila termofílica Cyanidium caldarium y ha encontrado que in vivo el enzima activo puede ser reversiblemente transformado en su forma inactiva por el amoníaco (48). In vitro, la nitrato reductasa latente se reactivaba por el calor y por tratamientos con fosfato, urea y p-CMB (49). El mismo autor ha sugerido en posteriores trabajos (50,51) que la interconversión de la nitrato reductasa puede representar un mecanismo regulador de la asimilación del nitrato, y que el amoníaco, o un compuesto derivado del mismo, puede controlar este mecanismo.

VENNESLAND y su grupo (52,53) han encontrado que

la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris aparece siempre en los extractos crudos en una forma inactiva que puede ser activada en presencia de nitrato y tampón fosfato de bajo pH. El mismo grupo ha puesto de manifiesto posteriormente (54) que la activación de la forma inactiva de la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris requiere un agente oxidante y se inhibe por CO. El NADH y NADPH producen la inactivación casi total del enzima no purificado (52), pero dicha inactivación es sólo parcial en preparaciones parcialmente purificadas. La adición de un componente, separado del extracto crudo, de bajo peso molecular aumenta el efecto inactivante de los piridín-nucleótidos reducidos sobre la nitrato reductasa parcialmente purificada (55). Recientemente, el mismo grupo ha comunicado (56) que es necesaria la adición de cianuro a una preparación de nitrato reductasa altamente purificada para que el NADH produzca, de forma rápida, la conversión reversible de la forma activa en la forma inactiva, sugiriendo que el cianuro pueda ser el compuesto de bajo peso molecular, dializable del extracto crudo, que potencia el efecto inactivante del piridín-nucleótido reducido.

El fenómeno de la interconversión metabólica de la nitrato reductasa no es exclusivo de las algas, y ha sido, igualmente, puesto de manifiesto en bacterias, hongos y plantas superiores. La nitrato reductasa de Azotobacter chroococcum (57) se inactiva rápidamente por el agente reductor ditionito en presencia de bajas concentraciones de nitrato. El cianato, un inhibidor competitivo respecto al nitrato de la nitrato reductasa de otras fuentes (15,21,53), puede proteger contra la inactivación por ditionito y nitrato y puede revertir el proceso una vez que ha ocurrido. El enzima de la levadura Torulopsis nitratophila (58) puede inactivarse por preincubación con metilviolólgeno reducido por ditionito, y el enzima reducido puede reactivarse instantáneamente por adición de ferriclanuro o por aireación. Recientemente (59) se ha puesto de manifiesto la existencia de dos formas interconvertibles de una NADH-nitrato reductasa de la bacteria nitrificante Nitrobacter agilis. El enzima se puede inactivar por preincubación con NADH, pero no con NADPH. Por otra parte, una serie de compuestos oxidantes, tales como nitrato, ferriclanuro,  $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ , son capaces de proteger contra dicha inactivación e incluso reactivar el enzi-

ma inactivo.

Parte de los resultados que se presentan en este trabajo muestran que la nitrato reductasa del alga verde Chlorella fusca está sujeta a regulación por oxidación y reducción. El complejo enzimático puede existir en dos formas interconvertibles tanto in vitro como in vivo: una activa, que se inactiva por reducción, y otra inactiva, que se activa por oxidación. El proceso de interconversión in vivo está estrechamente relacionado con las reacciones fotosintéticas propiamente dichas.

En organismos fotosintéticos, la actividad de ciertos enzimas claves en el metabolismo del  $\text{CO}_2$  está también controlada, al parecer, por el estado redox de la célula, el cual depende de la transición luz-oscuridad (60).

La ribulosa 1,5-difosfato carboxilasa, que cataliza la incorporación de  $\text{CO}_2$  a la ribulosa-1,5-difosfato en el ciclo de Calvin, es un enzima que se activa por la luz

(61). En el paso de luz a oscuridad, la velocidad de fijación de  $\text{CO}_2$  disminuye casi inmediatamente en células de Chlorella, y la nueva exposición a la luz hace que aumente la velocidad de fijación de  $\text{CO}_2$  en un tiempo muy corto.

La *gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa* (GPDH), que cataliza la reducción del ácido 1,3-difosfoglicérico a 3-fosfogliceraldehído, está también sometida a un mecanismo de regulación por la luz. Existen dos tipos de este enzima: uno dependiente de  $\text{NAD}^+$ , que se encuentra en tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos, y otro dependiente de  $\text{NADP}^+$ , que sólo está presente en materiales que contienen clorofila. Parece ser que la GPDH dependiente de  $\text{NADP}^+$  está implicada en la conversión de 3-fosfoglicerato a triosa fosfato en el ciclo reductivo de las pentosas-fosfato, mientras que la actividad dependiente de  $\text{NAD}^+$  está ligada solamente a la ruta glucolítica. Se ha puesto de manifiesto (62) que cuando un cultivo de células de Chlamydomonas reinhardtii se pone en la oscuridad desaparece completamente la actividad GPDH dependiente de  $\text{NADP}^+$  y aumenta la actividad del enzima dependiente de  $\text{NAD}^+$ . Cuando las células cultivadas en la oscuridad se ponen en la luz hay un

aumento en la actividad del enzima dependiente de  $\text{NADP}^+$  y una disminución concomitante en la dependiente de  $\text{NAD}^+$ . Sobre la base de estos resultados se ha sugerido que estos enzimas pueden ser interconvertibles, y que la conversión de la forma dependiente de  $\text{NAD}^+$  a la dependiente de  $\text{NADP}^+$  esta mediada por la luz. Posteriormente, se ha demostrado que el  $\text{NADPH}$  es capaz de producir in vitro el mismo efecto que la luz provoca in vivo (63).

La *fructosa difosfatasa*, que, en el ciclo de Calvin, cataliza la conversión de la fructosa-difosfato en fructosa-6-P, también parece estar regulada por la luz. La actividad de FDPase en células de *Euglena gracilis* (64) cultivadas en la oscuridad es muy pequeña. Cuando las células cultivadas en la oscuridad se pasan a la luz, la actividad FDPase aumenta paralelamente a la formación de clorofila. En cloroplastos de espineca BUCHANAN y col. (65) han encontrado que la activación de la FDPase requiere ferredoxina reducida, un factor proteico y  $\text{Mg}^{++}$ . La formación de ferredoxina reducida por las reacciones fotoquímicas activaría la FDPase. La transición a la oscuridad detendría la reducción de ferredoxina y por tanto disminu-

ría la actividad de la FDPasa.

Por último, *ribulosa 5-fosfato quinasa*, otro enzima del ciclo reductivo de las pentosas-fosfato, parece también estar sometido a regulación por la luz. Se ha puesto de manifiesto que el AMP inhibe la fijación de  $\text{CO}_2$  dependiente de ATP en extractos crudos de varios organismos fotosintéticos y quimiosintéticos (66) localizándose este efecto sobre la *ribulosa 5-fosfato quinasa*. Por otro lado se ha demostrado que el NADH también estimula la fijación de  $\text{CO}_2$  afectando al mismo enzima. La *ribulosa 5-fosfato quinasa* responde cooperativamente al ATP, uno de sus sustratos, y al NADH, un efector positivo. Según estos resultados, la fijación de  $\text{CO}_2$  -y la actividad de la *ribulosa 5-fosfato quinasa*- estaría regulada por el estado energético y redox de la célula, inducido por la luz.

En el presente trabajo hemos estudiado la regulación del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella fusca*, tanto in vivo como in vitro, con objeto de esclarecer el mecanismo de inactivación de dicho enzima por el amoníaco.

También hemos hecho un estudio profundo de la mitad NADH-diaforasa, lo que nos ha permitido comprender con mayor detalle la participación de esta primera actividad enzimática en la regulación del complejo.

Parte de este trabajo ha sido ya publicado (68) o se encuentra en vías de publicación (69), habiendo sido también objeto de comunicaciones en Congresos nacionales (70,71) e internacionales (72,73).

## **II. MATERIALES Y METODOS**

## 1. CULTIVO DE LAS CELULAS

### 1.1. Material y medio de cultivo

El microorganismo utilizado en el presente trabajo ha sido el alga verde Chlorella fusca Shihira et Krauss (= C. pyrenoidosa Chick 211-15) procedente de la colección Pringsheim de Göttingen.

El medio de cultivo era esencialmente el mismo que el descrito por KESSLER (74), salvo modificaciones, y contenía los siguientes compuestos a las concentraciones que se indican:

$\text{NO}_3\text{K}$ , 8 mM;  $\text{ClNa}$ , 8 mM;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , 10 mM;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ , 10 mM;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 1 mM;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 0,1 mM;  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , 20  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Cl}_2\text{Mn}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ ;  $\text{BO}_3\text{H}_3$ , 8  $\mu\text{M}$ ;  $\text{SO}_4\text{Zn}$ , 0,7  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MoO}_4\text{Na}_2$ , 0,1  $\mu\text{M}$  y EDTA, 34  $\mu\text{M}$ .

Este medio se usó sin esterilizar ya que, al no contener fuente de carbono y dada la gran masa de células de Chlorella que se utilizó como inóculo, la contaminación era mínima, como se comprobó por examen microscópico del

cultivo.

Para la preparación del inóculo se partió de células cultivadas sobre agar, o bien de las procedentes de anteriores cultivos en medio líquido. Estas células se cultivaron a 25°C en tubos con 250 ml de medio por los que se hacían pasar una corriente de aire conteniendo un 5% (v/v) de CO<sub>2</sub>. La iluminación se hizo con tubos fluorescentes de luz blanca que proporcionaban 1.200 lux en la superficie del tubo de cultivo.

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

En los casos en que se llevó a cabo una purificación parcial del enzima (en experimentos de regulación in vitro), fué necesario obtener una mayor masa de células para lo cual el alga se cultivó en frascos de Roux de 1 litro de capacidad.

## **1.2. Condiciones especiales de cultivo**

En los experimentos que implicaron tratamiento con arseniato, el fosfato sódico se puso a concentración diez veces menor, es decir, 2 mM.

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

En aquellos experimentos en que se suprimió la aireación, los cultivos se gasaron con argón que llevaba un 5% de  $\text{CO}_2$ .

## **1.3. Medida del crecimiento**

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

## 2. ENZIMAS

### 2.1. Preparación de los extractos libres de células

Las células se recogieron en su fase exponencial de crecimiento. Para separarlas del medio de cultivo, se centrifugaron durante 5 minutos a  $13.000 \times g$ . Las células recogidas se resuspendieron en 40 ml de agua destilada y se centrifugaron a continuación durante 5 minutos a  $27.000 \times g$ . Se recogió el sedimento de células lavadas y se rompieron a  $4^{\circ}C$  en un mortero con alúmina en la proporción aproximada de 3 gramos de alúmina por cada gramo de células. El material roto se extrajo con tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, en la proporción de 8 ml de tampón por cada gramo de células. El material extraído se centrifugó durante 15 minutos a  $47.000 \times g$  y el sobrenadante de esta centrifugación constituyó el extracto crudo libre de células para la determinación de actividades enzimáticas o para la purificación del enzima.

Las centrifugaciones se realizaron en una SORVALL RC2-B refrigerada.

## 2.2. Purificación parcial de la nitrato reductasa

La nitrato reductasa se purificó a partir de los extractos crudos libres de células según el método ya descrito previamente para este alga (7,9), con algunas variantes. Los pasos fundamentales fueron:

### *2.2.1. Tratamiento con sulfato de estreptomioina*

Al extracto crudo libre de células se le añadió gota a gota una disolución 0,1 M de sulfato de estreptomicina en la proporción de 2 ml de la disolución de estreptomicina por cada 20 ml de extracto. Después de 10 minutos a 0°C y con agitación ocasional, se centrifugó durante 10 minutos a 27.000 x g y se recogió el sobrenadante.

### *2.2.2. Precipitación con sulfato amónico*

Al sobrenadante anterior se le añadió una disolución saturada de sulfato amónico (ajustada a pH 7 con  $\text{HONH}_4$  concentrado) hasta alcanzar un 50% de saturación. Después de mantener la mezcla durante 15 minutos a 0°C con agitación ocasional, se centrifugó durante 10 minutos a 27.000 x g.

El precipitado obtenido se resuspendió en Tris 50 mM, pH 7,5. Con esta preparación se realizaron algunos de los experimentos que se describen más adelante.

### 2.3. Ensayo de actividades enzimáticas

#### 2.3.1. *Determinación de la actividad NADH-nitrato reductasa*

Esta actividad se ensayó mediante la medida del nitrito formado en una mezcla de reacción que contenía, en un volumen de 1 ml, Tris-ClH 100 mM, pH 7,5,  $\text{NO}_3\text{K}$  10 mM, NADH 0,3 mM y la preparación enzimáticas (3,7,75). Después de incubar a 30°C durante 10 minutos, la reacción se detuvo añadiendo 1 ml de reactivo de sulfanilamida, seguida de la adición de 1 ml de reactivo de N(-naftil)etiléndiamina (76). La mezcla se completó con agua hasta un volumen de 5 ml y se dejó desarrollar el color durante 10 minutos antes de la lectura en el fotocolorímetro.

Se toma como unidad de nitrato reductasa la cantidad de enzima que, en las condiciones standard del ensayo, cataliza la formación de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NO}_2^-$  por minuto, y como unidad de actividad específica el número de unidades de en-

zima por mg de protefna.

### 2.3.2. *Determinación de la actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa*

La actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se determinó del mismo modo que la NADH-nitrato reductasa, pero usando en este caso como donador de electrones FMN (2 mM) reducido con S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> (8 mg de S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> en 1 ml de una disolución de CO<sub>3</sub>HNa de 8 mg/ml). La reacción se detuvo mediante agitación vigorosa hasta que el S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> se oxidó por completo y apareció en la mezcla de reacción el color amarillo del FMN oxidado (75).

La unidad de FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se definió igual que la de NADH-nitrato reductasa.

### 2.3.3. *Determinación de la actividad NADH-diaforasa*

Esta actividad se ensayó, según el método descrito previamente en este laboratorio (77,78), midiendo espectrofotométricamente la velocidad de reducción del citocromo c. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final

de 2 ml, Tris-ClH 100 mM, pH 7,5, NADH 0,15 mM, citocromo c 0,06 mM y la cantidad apropiada de enzima.

La unidad de NADH-diaforasa se toma como la cantidad de enzima que, en las condiciones del ensayo standard, cataliza la oxidación de 1  $\mu\text{mol}$  de NADH por minuto.

### 3. METODOS ANALITICOS

#### 3.1. Determinación de nitrito

El nitrito formado se determinó por la reacción de diazotación de GRIESS-YLOSWAY, según el método de SNELL y SNELL (76), a partir de una recta de calibrado construida con concentraciones conocidas de nitrito.

#### 3.2. Determinación de amoniaco

El amoniaco se determinó colorimétricamente con el reactivo de Nessler, después de destilarlo en medio básico y fijarlo en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,01 N, según el método de CONWAY (79).

#### 3.3. Determinación de protefna

Para la determinación de la cantidad de protefna se siguió el método de LOWRY et al (80), utilizando ovoalbúmina como protefna patrón.

En las preparaciones enzimáticas que contenían sulfato amónico, la protefna se determinó según el método

WARBURG y CHRISTIAN (61).

### 3.4. Determinación espectrofotométricas

Se utilizaron indistintamente espectrofotómetros Beckman DK-2A ó Pye Unicam SP 1800 para medir la reducción del citocromo c a 550 nm, así como para las demás medidas de absorbancia a longitudes de onda correspondientes al ultravioleta.

Las medidas de compuestos coloreados se realizaron en espectrofotómetros Bausch & Lomb Spectronic 20 ó Spectronic 700. El producto coloreado que aparece al valorar el nitrito se midió a 540 nm y el que aparece al determinar la proteína por el método de LOWRY se leyó a 500 nm.

El coeficiente de extinción molar del citocromo c reducido a 550 nm y para un paso de luz de 1 cm es de  $28 \times 10^3$ .

### 3.5. Determinación de pH

El pH de las disoluciones, mezclas, tampones y medios de cultivo, se determinó con un medidor de pH Beckman

**modelo Expandomatic 6 con un medidor de pH Methrom modelo E-512 con escala expandida.**

#### 4. REACTIVOS

##### 4.1. Procedencia de los productos químicos

Los piridín-nucleótidos, flavin-nucleótidos, nucleótidos y nucleósidos púricos y pirimidícos, Tris, menadiona y p-hidroximercuribenzoato se obtuvieron de SIGMA, St. Louis, USA; el citocromo c, de SERVA, Heidelberg, Alemania; el ferricianuro potásico, sulfato amónico, arseniato sódico, clorhidrato de metilamina, azida, cianato y carbamil fosfato, de MERCK, Darmstadt, Alemania; la alúmica de grado bacteriológico empleada en la rotura de células, de ALCOA, Arkansas, USA y el sulfato de estreptomina de la Cía. Española de Penicilina. El resto de los productos utilizados se adquirieron a las firmas SIGMA, MERCK, RIEDEL y CARLO ERBA, siendo todos ellos de grado analítico.

El agua destilada para preparar las disoluciones y lavar el material de laboratorio era agua desionizada por cambio iónico en un desmineralizador SETA tipo R-100 serie 2/67.

El CO<sub>2</sub> fué suministrado por Coromina Industrial el gas argón provenía de la S.E.O.

### **III. RESULTADOS**

1. REGULACION DE LA ACTIVIDAD  $\text{FNH}_2$ -NITRATO REDUCTASA DEL COMPLEJO ENZIMATICO NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca

1.1. Interconversión in vitro entre las formas activa e inactiva de la nitrato reductasa de Chlorella

1.1.1. *Inactivación reversible por los piridín-nucleótidos reducidos*

La Tabla I muestra el efecto de los piridín-nucleótidos sobre las distintas actividades del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella. Como puede observarse, tanto el NADH como el NADPH -éste en menor grado- produjeron la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ - y NADH-nitrato reductasa, no observándose ningún efecto sobre la NADH-diaforasa. Las formas oxidadas de ambos piridín-nucleótidos no afectaron de modo significativo a ninguna de las tres actividades.

En la misma Tabla se puede ver que el ferricianuro potásico, agente fuertemente oxidante, provoca la reactivación casi instantánea del enzima inactivado por reducción con NAD(P)H.

TABLA I

EFFECTO DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS SOBRE LAS TRES ACTIVIDADES DEL COMPLEJO  
ENZIMATICO NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Adición	Actividades relativas (%)				
	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa		FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa		NADH-diaforasa
	Tratada con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		Tratada con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		
Ninguna	100	100	100	100	100
NAD <sup>+</sup>	89	97	95	98	97
NADH	18	94	25	101	104
NADP <sup>+</sup>	102	92	99	102	96
NADPH	25	98	36	98	101

El enzima parcialmente purificado (1 mg) se preincubó durante 4 horas a 0°C, en un volumen de 1 ml, con 300 µmoles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y los nucleótidos indicados a la concentración de 0,3 mM cada uno. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas de preincubación y se expresan como tantos por ciento de las del control sin adición.

\* Las mezclas se incubaron con ferricianuro potásico 0,3 mM durante 2 minutos a 0°C antes del ensayo de la actividad.

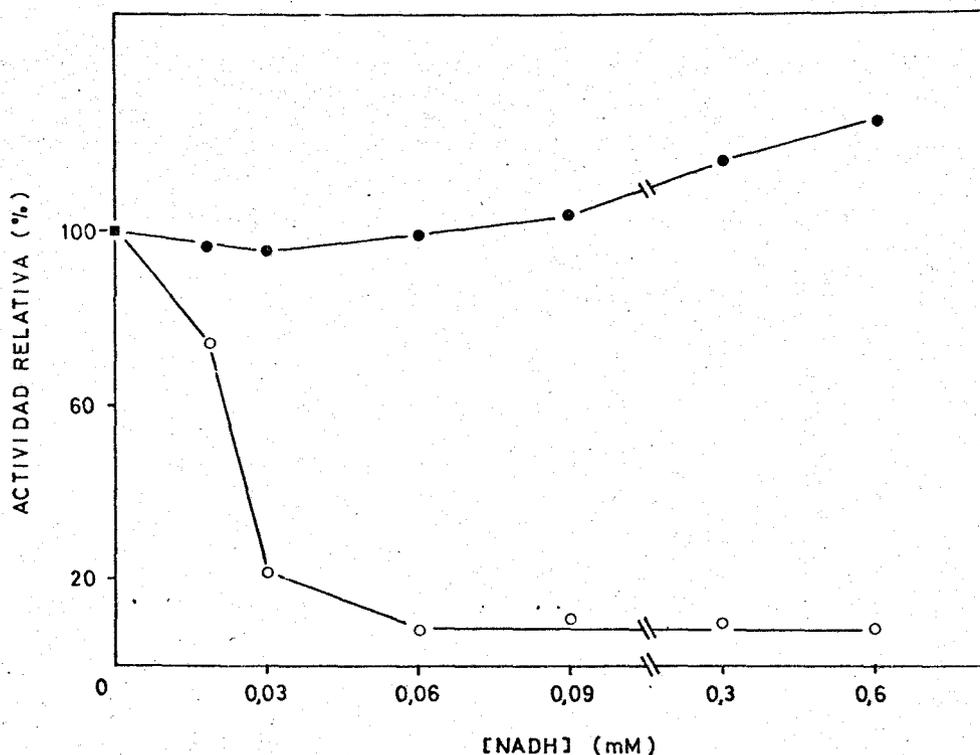


Fig. 1. Efecto de la concentración de NADH sobre la inactivación reversible de la nitrato reductasa de *Chlorella*. El enzima (2,1 mg de extracto crudo) se preincubó durante 1 hora a temperatura ambiente en 1 ml de tampón Tris-ClH 0,5 M, pH 7,5, 10  $\mu$ M en FAD con NADH a las concentraciones indicadas. Las actividades de NADH-nitrato reductasa se determinaron, antes (o) y después (●) de tratar con ferricianuro, en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas de preincubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin NADH.

La inactivación de la nitrato reductasa por preincubación con NADH ó NADPH es dependiente de la concentración del piridín-nucleótido. La Figura 1 muestra el efecto de diferentes concentraciones de NADH sobre la actividad NADH-nitrato reductasa. Se observa que la inactivación es mayor a medida que aumenta la concentración de NADH, llegando a ser prácticamente total a partir de una concentración de 0,06 mM. En la misma Figura puede también observarse que, en todos los casos, el tratamiento con ferricianuro produjo la reactivación del enzima inactivo.

#### 1.1.2. *Reactivación por ferricianuro de una preparación de nitrato reductasa inactiva carente de actividad diaforásica*

La Tabla II muestra que el ferricianuro potásico provoca la reactivación de la nitrato reductasa inactiva, cuya actividad diaforásica ha sido previamente inactivada por tratamiento térmico. Estos resultados sugieren que la acción del ferricianuro puede tener lugar directamente sobre la actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa sin el concurso de la NADH-diaforasa (cf, 82).

TABLA II

REACTIVACION POR FERRICIANURO DE UNA PREPARACION DE NITRATO  
 REDUCTASA DE Chlorella INACTIVA Y CARENTE DE  
 ACTIVIDAD DIAFORASICA

Tratamiento	Actividades enzimáticas (mU/ml)		
	FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa		NADH-diaforasa
	Tratada con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		
Ninguno	11	92	285
Enzima calentado	9	86	3

El enzima (extracto crudo de 2,7 mg de proteína/ml) en su forma inactiva, se dividió en dos porciones, una de las cuales se calentó a 45°C durante 5 min. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes fracciones.

\* Las preparaciones enzimáticas se preincubaron con ferricianauro potásico 0,3 mM durante 2 minutos a 0°C antes del ensayo de actividad.

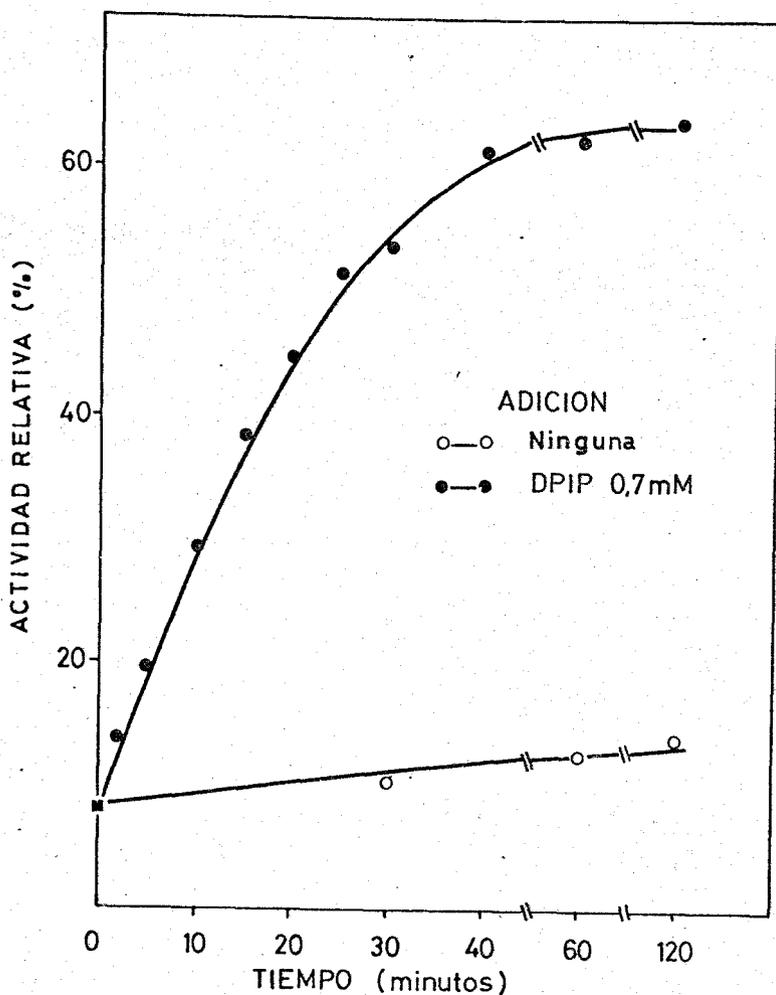


Fig. 2. Reactivación por DPIP de una preparación de NADH-nitrato reductasa inactiva de *Chlorella*. 2,8 mg de enzima inactivo parcialmente purificado se preincubaron a temperatura ambiente, en un volumen de 1 ml, con 150  $\mu$ moles de tampón fosfato, pH 6,7 y DPIP 0,7 mM. A los tiempos indicados, las actividades de NADH-nitrato reductasa se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas y se expresan como tantos por ciento de la actividad del enzima tratado con ferricianuro.

### 1.1.3. *Reactivación por 2,6-diclorofenol indofenol*

El DPIP, otro compuesto oxidante, dió también lugar a la reactivación de la nitrato reductasa inactiva. En efecto, como se observa en la Figura 2, el DPIP reactiva paulatinamente con el tiempo a la nitrato reductasa inactiva hasta alcanzar un máximo estacionario a los 40 minutos de preincubación. La actividad del enzima sin DPIP no se alteró prácticamente durante ese tiempo.

### 1.2. Regulación in vivo de la actividad de la nitrato reductasa de *Chlorella*

Los resultados que se describen a continuación ponen de manifiesto que la adición de amoníaco, metilamina o arseniato a un cultivo de *Chlorella fusca*, creciendo en la luz con dióxido de carbono y nitrato, provoca la rápida inactivación de la nitrato reductasa por conversión de la forma activa (oxidada) en otra inactiva (reducida).

#### 1.2.1. *Inactivación reversible de la nitrato reductasa por el amoníaco*

La Figura 3 muestra la inactivación in vivo de la

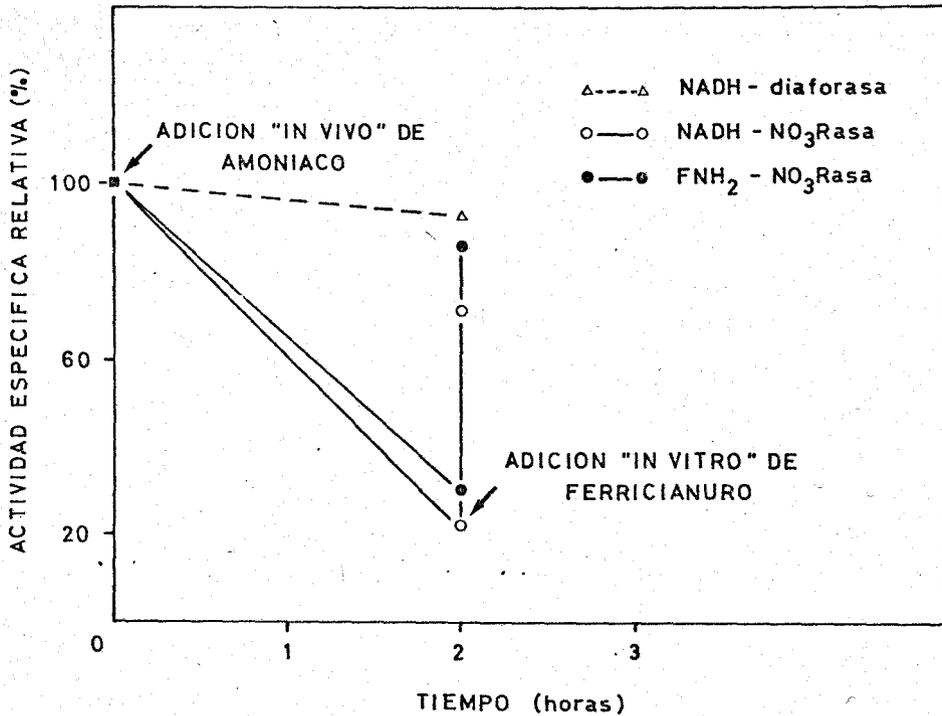


Fig. 3. Inactivación *in vivo* de la nitrato reductasa de *Chlorella* por adición de amoniaco y reactivación *in vitro* por ferricianuro. La primera flecha indica el tiempo en que se añadió el amoniaco (16 mM) a un cultivo de células en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos. La segunda flecha señala la adición *in vitro* de ferricianuro (0,3 mM) al extracto crudo. Las actividades enzimáticas se determinaron en los correspondientes extractos libres de células a los tiempos indicados.

nitrate reductase (assayed as NADH-nitrate reductase or  $\text{FNH}_2$ -nitrate reductase) after the addition of ammonia to a culture of cells of Chlorella growing in the light with nitrate. It is observed that the presence of ammonia in the medium provokes, in a relatively short period of time (2 hours), the inactivation of the  $\text{FNH}_2$ -nitrate reductase without affecting sensibly the diazotrophic activity.

The nitrate reductase inactivated by the addition of ammonia to the culture medium, is reactivated in a nearly instantaneous manner, in vitro, by treatment with ferricyanide.

### 1.2.2. *Inactivación reversible de la nitrate reductase por el arseniato*

Ammonia, the final product of the metabolic pathway catalyzed by the nitrate reductase system, has the interesting property of acting as an effective uncoupler of non-cyclic photophosphorylation (83), stimulating the flow of electrons. In previous experiences we have seen that the nitrate reductase in its active form can be transformed into its inactive form in vi -

tro, por adición de los piridín-nucleótidos reducidos, como in vivo, por la presencia de amoníaco en el medio de cultivo. En ambos casos, el enzima inactivo puede reactivarse in vitro por reoxidación con ferricianuro. Estos hechos nos condujeron a la hipótesis de que el efecto inactivante del amoníaco sobre la nitrato reductasa fuese debido a una reducción indirecta del enzima como consecuencia del aumento del nivel del poder reductor en la célula provocado por su acción desacoplante.

En consecuencia, era interesante estudiar comparativamente el efecto in vivo de diversos desacoplantes de la fosforilación fotosintética sobre la actividad de la nitrato reductasa.

El arseniato ha sido descrito (83) como un desacoplante de la fotofosforilación no cíclica en cloroplastos aislados.

La Figura 4 presenta la inactivación in vivo de la nitrato reductasa (ensayada como NADH-nitrato reductasa ó como FMN<sub>2</sub>-nitrato reductasa) después de la adición de ar-

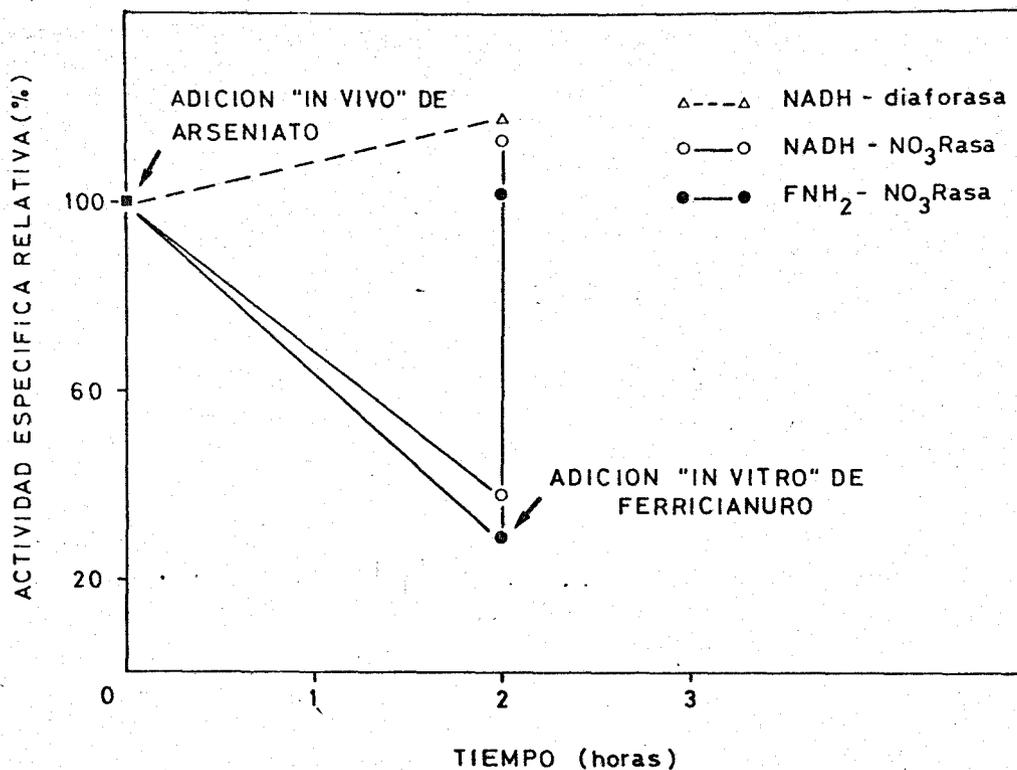


Fig. 4. *Inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella por adición de arseniato y reactivación in vitro por ferricianuro.* Las condiciones experimentales fueron idénticas a las de la Figura 3, excepto que, en vez de amoníaco, se usó arseniato (30 mM).

seniato (30 mM) a un cultivo de células de Chlorella creciendo en la luz con nitrato como fuente de nitrógeno. Se observa que, al igual que en el caso del amoníaco, su presencia en el medio de cultivo provoca la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa sin afectar de manera significativa a la actividad NADH-diaforasa. La nitrato reductasa inactivada de esta forma se muestra también sensible al tratamiento por ferricianuro, reactivándose por dicho agente oxidante.

### 1.2.3. Inactivación reversible de la nitrato reductasa por la metilamina

La metilamina también ha sido igualmente descrita como potente agente desacoplante de la fosforilación fotosintética (84). La Figura 5 muestra el efecto de la adición de metilamina a un cultivo de células de Chlorella creciendo en la luz con nitrato. Se observa que dicho agente desacoplante da lugar a la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa, y por tanto de la NADH-nitrato reductasa, que llega a inactivarse totalmente al cabo de unas horas de tratamiento. Como puede observarse en la misma Figura, la metilamina no produ-

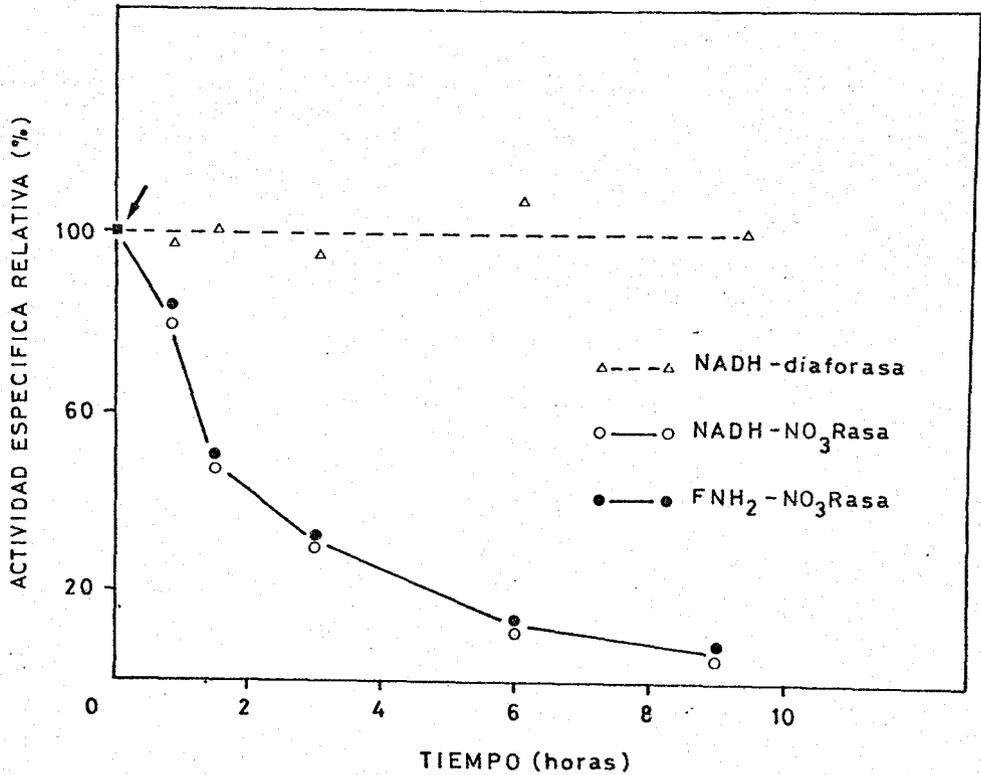


Fig. 5. Cinética de la inactivación de la nitrato reductasa por la metilamina en células de *Chlorella*. La flecha indica el tiempo en que se añadió la metilamina (30 mM) a un cultivo de células en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos. Las actividades enzimáticas se determinaron en los correspondientes extractos crudos a los tiempos indicados.

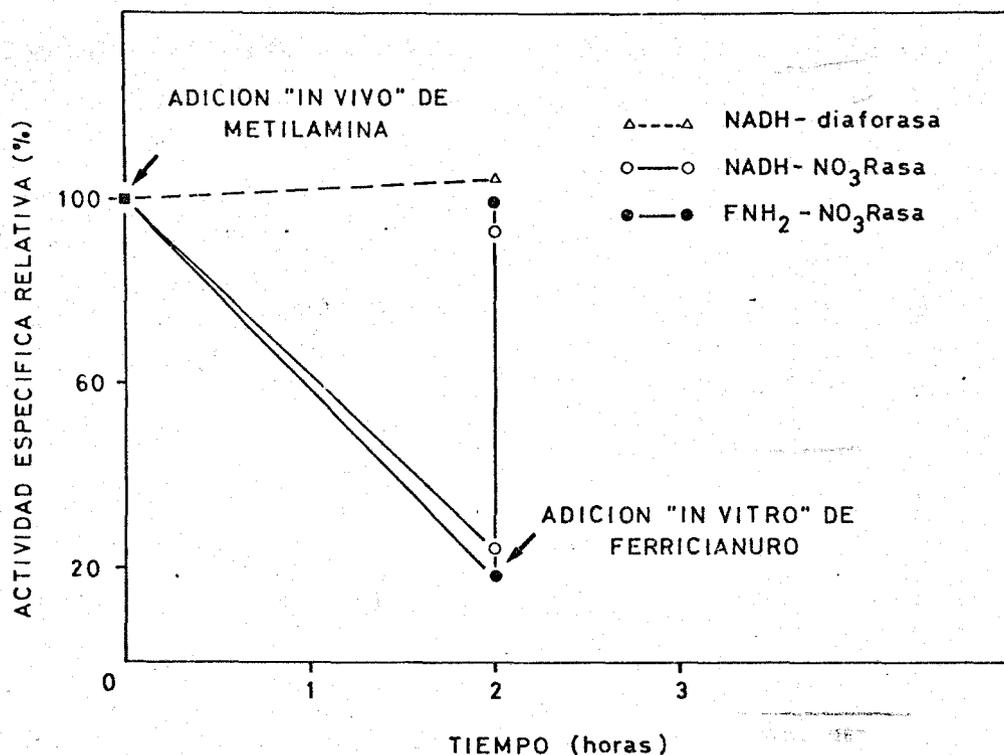


Fig. 6. *Inactivación in vivo* de la nitrato reductasa de *Chlorella* por adición de metilamina y reactivación *in vitro* por ferricianuro. Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la Figura 3, excepto que, en vez de amoníaco, se usó metilamina (30 mM).

Jo cambio apreciable en el nivel de la NADH-diaforasa.

Como en los casos anteriores, el enzima inactivo por adición de metilamina al medio de cultivo, puede también reactivarse in vitro por reoxidación con ferricianuro (Figura 6).

Con objeto de ver si la metilamina podía servir como fuente de nitrógeno a las células de Chlorella, se cultivó el alga en medios de cultivo con diferentes fuentes de nitrógeno. El crecimiento, estimado por absorbancia a 660 nm, se muestra en la Figura 7. Puede apreciarse un gran paralelismo entre las curvas de crecimiento en nitrato y amoníaco. En el cultivo con metilamina como fuente de nitrógeno no hubo crecimiento durante las primeras 40 horas, pero a partir de este periodo las células comenzaron a crecer de forma exponencial, si bien con turbidez y formación de grumos. A fin de investigar la razón de este crecimiento después de dicho periodo, se ensayó la posible presencia de amoníaco en el medio de cultivo, observándose que el comienzo del crecimiento coincidía con la aparición del mismo en el medio.

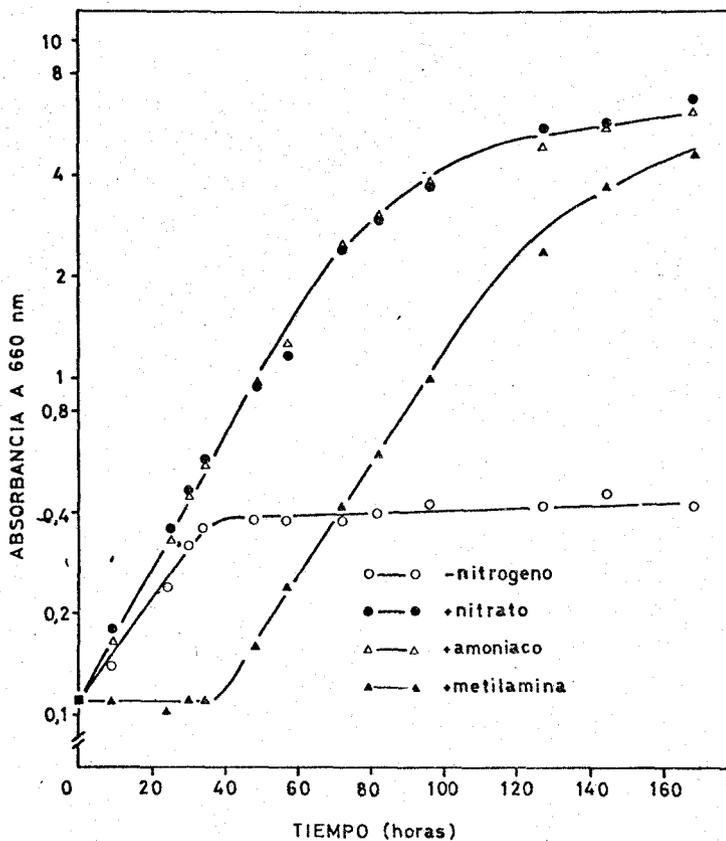


Fig. 7. Crecimiento de *Chlorella fusca* en medio con metilamina como fuente nitrogenada. Células procedentes de un inóculo en nitrato se cultivaron en diferentes medios con las fuentes de nitrógeno indicadas en la Figura a la concentración de 8 mM cada una. A los tiempos indicados se determinó la absorbancia a 660 nm.

#### 1.2.4. *Protección por menadiona contra la inactivación por amoníaco de la nitrato reductasa*

Con anterioridad hemos visto que diversos agentes desacoplates de la fotofosforilación no cíclica -que causan directamente la elevación del poder reductor de la célula- producen in vivo la inactivación de la nitrato reductasa. Por tanto la eliminación de dicho poder reductor a medida que se vá formando, debería obviar la inactivación del enzima. La vitamina  $K_3$  (menadiona) tiene la propiedad de fotooxidar el poder reductor producido en la fotofosforilación no cíclica (85).

En la Tabla III se muestra que, en presencia de menadiona en el cultivo, no se producía inactivación de la nitrato reductasa por adición de amoníaco.

#### 1.2.5. *Protección por menadiona $K_3$ contra la inactivación por arseniato de la nitrato reductasa*

La Tabla IV muestra que la presencia de menadiona impide la inactivación de la nitrato reductasa al añadir el agente desacoplante arseniato al cultivo de Chlorella.

TABLA III

PROTECCION POR LA MENADIONA CONTRA LA INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella POR ADICION DE AMONIACO

Tratamiento	Actividades específicas relativas (%)		
	NADH- NO <sub>3</sub> Rasa	FNH <sub>2</sub> - NO <sub>3</sub> Rasa	NADH- diaforasa
Control	100	100	100
más amoniaco	18	20	92
más amoniaco, menadiona	145	120	97

Células cultivadas en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos se sometieron durante 2 horas a los tratamientos indicados. Las actividades enzimáticas se determinaron en los correspondientes extractos crudos y se expresan como tantos por ciento de las del control sin tratar. Amoniaco, 16 mM; menadiona, 0,5 mM.

TABLA IV

PROTECCION POR LA MENADIONA CONTRA LA INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella POR ADICION DE ARSENIATO

Tratamiento	Actividades específicas relativas (%)		
	NADH- NO <sub>3</sub> Rasa	FNH <sub>2</sub> - NO <sub>3</sub> Rasa	NADH- diaforasa
Control	100	100	100
más arseniato	25	14	71
más arseniato, menadiona	106	91	81

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las de la Tabla III, excepto que, en vez de amoniaco, se usó arseniato (30 mM).

1.2.6. *Protección por menadiona contra la inactivación por metilamina de la nitrato reductasa*

Al igual que en los dos casos anteriores, cuando se añadió menadiona al cultivo, no se produjo inactivación de la nitrato reductasa por acción de la metilamina (Tabla V).

1.2.7. *Reactivación in vivo de la nitrato reductasa en presencia de menadiona*

Según hemos indicado, cuando se adiciona metilamina (u otro de los desacoplantes estudiados) a un cultivo de células de Chlorella se produce la inactivación de la nitrato reductasa.

En la Figura 8 se muestra la inactivación in vivo del enzima a las 2 horas de haber añadido metilamina al cultivo de células. Como puede verse, el enzima inactivo se reactiva rápidamente cuando se remueve la metilamina del medio de cultivo, siendo el proceso casi instantáneo en presencia de menadiona.

TABLA V

PROTECCION POR LA MENADIONA CONTRA LA INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella POR ADICION DE METILAMINA

Tratamiento	Actividades específicas relativas (%)		
	NADH- NO <sub>3</sub> Rasa	FNH <sub>2</sub> - NO <sub>3</sub> Rasa	NADH- diaforasa
Control	100	100	100
más metilamina	25	29	108
más metilamina, menadiona	98	96	102

Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la Tabla III, excepto que, en vez de amoniaco, se usó metilamina (30 mM).

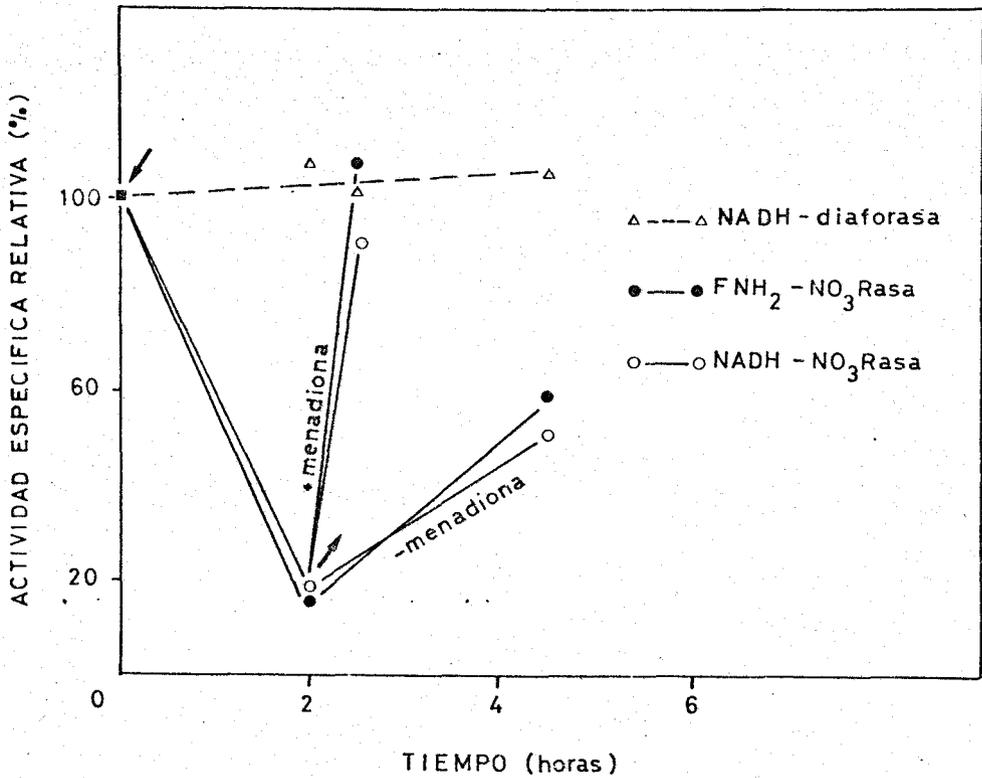


Fig. 8. Efecto de la menadiona sobre la reactivación *in vivo* de la nitrato reductasa de *Chlorella*. La primera flecha indica el tiempo en que se añadió metilamina (30 mM) a un cultivo de células en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos. La segunda flecha indica el tiempo en que se recogieron y resuspendieron dichas células en el medio original de nitrato y en presencia o ausencia de menadiona. Las actividades se determinaron en los correspondientes extractos crudos a los tiempos indicados.

1.2.8. *Requerimiento de luz para la inactivación por amoníaco ó metilamina de la nitrato reductasa*

Los resultados anteriores indican que el mecanismo de inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella, por acción de los agentes desacoplantes citados, está íntimamente relacionado con el proceso de fotosíntesis. Para ratificarlo estudiamos el efecto de estos desacoplantes en ausencia de luz.

La Tabla VI muestra que en la oscuridad, el amoníaco no sólo no ejerce ningún efecto inactivante sobre la nitrato reductasa, sino que incluso produce estimulación de dicha actividad.

Análogamente, la metilamina tampoco dió lugar a la inactivación de la nitrato reductasa cuando se suprimió la iluminación de los cultivos (Tabla VII).

Como puede observarse en ambas Tablas, la NADH-diaforasa no se afecta por los tratamientos.

TABLA VI

REQUERIMIENTO DE LUZ PARA LA INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO  
REDUCTASA DE Chlorella POR ADICION DE AMONIACO

Tratamiento	Actividades específicas relativas (%)		
	NADH- NO <sub>3</sub> Rasa	FNH <sub>2</sub> - NO <sub>3</sub> Rasa	NADH- diaforasa
Control	100	100	100
más amoniaco, luz	23	31	91
más amoniaco, oscuridad	200	195	93

Células cultivadas en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos se sometieron durante 90 min a los tratamientos que se indican. Las actividades enzimáticas se determinaron en los correspondientes extractos crudos y se expresan como tantos por ciento de las del control sin tratar. Amoniaco, 16 mM.

TABLA VII

REQUERIMIENTO DE LUZ PARA LA INACTIVACION in vivo DE LA NITRATO  
REDUCTASA DE Chlorella POR ADICION DE METILAMINA

Tratamiento	Actividades específicas relativas (%)		
	NADH- NO <sub>3</sub> Rasa	FNH <sub>2</sub> - NO <sub>3</sub> Rasa	NADH- diaforasa
Control	100	100	100
más metilamina, luz	32	31	104
más metilamina, oscuridad	81	79	127

Las condiciones experimentales fueron idénticas a las de la Ta-  
bla VI, excepto que en vez de amoníaco, se usó metilamina (30  
mM).

### 1.2.9. Inactivación reversible de la nitrato reductasa por anaerobiosis

El amoníaco, el arseniato y la metilamina son de sacoplantes de la fotofosforilación no cíclica, incrementan do como consecuencia el nivel redox de la célula y produciendo por tanto, de una forma indirecta, la inactivación reversible del enzima. Según esto, es lógico pensar que si se suprime la aireación del medio de cultivo, las células acumularían poder reductor, lo cual llevaría consigo la inactivación de la nitrato reductasa.

Como se observa en la Figura 9, la eliminación del aire de un cultivo de células de Chlorella creciendo en la luz con nitrato provoca la inactivación de la nitrato reductasa en un corto período de tiempo. Cuando se restablece la aireación, el enzima se reactiva rápidamente hasta alcanzar su actividad original. El nivel enzimático de diáforasa no se alteró sensiblemente durante el tratamiento.

El enzima inactivado in vivo por anaerobiosis puede reactivarse in vitro por reoxidación con ferricianuro (Tabla VIII).

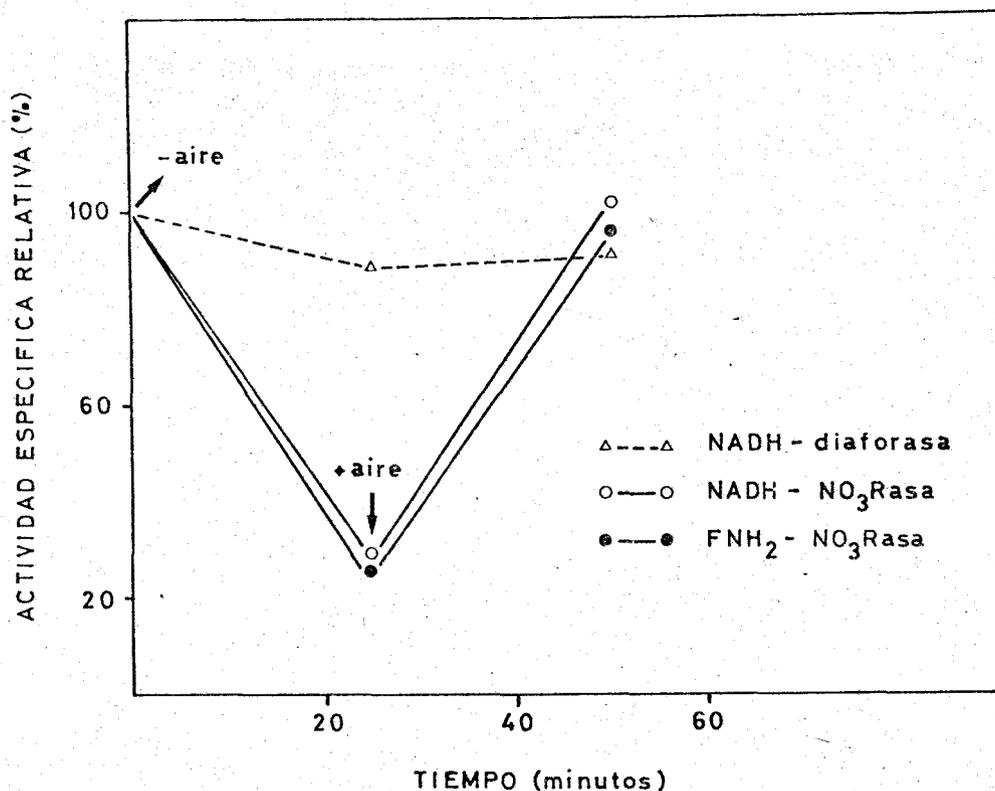


Fig. 9. Cinética de la inactivación reversible de la nitrato reductasa por anaerobiosis en células de *Chlorella*. La primera flecha indica el tiempo en que se eliminó la aireación a un cultivo de células en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos. La segunda flecha indica el tiempo en que se restableció la aireación. Las actividades enzimáticas se determinaron en los correspondientes extractos crudos a los tiempos indicados.

TABLA VIII

REACTIVACION in vitro POR FERRICIANURO DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella INACTIVADA  
in vivo POR ANAEROBIOSIS

Tratamiento	Actividades específicas relativas (%)				
	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa		FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa		NADH-diaforasa
	Tratada con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		Tratada con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		
Control	100	100	100	100	100
menos aire	41	97	52	104	85

Células cultivadas en nitrato bajo las condiciones descritas en Métodos se sometieron durante 1 hora al tratamiento indicado. Las actividades enzimáticas se determinaron en los correspondientes extractos crudos y se expresan como tantos por ciento de las del control sin tratar.

\* Los extractos se incubaron con ferricianuro potásico 0,3 mM durante 2 minutos a 0°C antes del ensayo de la actividad.

### 1.3. Regulación *in vitro* de la actividad de la nitrato reductasa de *Chlorella*

Los resultados presentados en el apartado anterior indican que el amoniaco, producto final de la ruta metabólica catalizada por el sistema reductor de nitrato, promueve la inactivación de la nitrato reductasa in vivo al actuar como desacoplante de la fotofosforilación y estimular el flujo de electrones, lo que determina un aumento del poder reductor de la célula.

Como se discute a continuación, es de gran importancia que no sólo el NADH, sino también el ADP (el otro producto de la acción desacoplante del amoniaco) se requieren simultáneamente para conseguir una mayor velocidad de inactivación de la nitrato reductasa.

#### *1.3.1. Efecto de diferentes nucleótidos sobre la inactivación de la nitrato reductasa*

En la Tabla IX se muestran los resultados que se obtuvieron al preincubar la nitrato reductasa con diferentes nucleótidos.

TABLA IX

EFFECTO DE DIFERENTES NUCLEOTIDOS SOBRE LA INACTIVACION DE  
LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	100
NADH	75
NADH + ATP	88
NADH + ADP	10
NADH + AMP	77
NADH + GDP	90
NADPH	79
NADPH + ADP	86
NAD <sup>+</sup> + ADP	115

El enzima parcialmente purificado (3 mg) se preincubó durante 90 min a 0°C, en un volumen de 1 ml, con 200  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y los nucleótidos indicados a la concentración de 0,3 mM cada uno. Las actividades de NADH-nitrato reductasa se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas de preincubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición.

Como puede observarse, el NADH junto con el ADP redujeron la actividad del enzima un diez por ciento respecto al control al final de los 90 minutos de preincubación. El efecto fué específico del ADP, ya que el AMP, ATP y GDP fueron mucho menos efectivos. En relación con la especificidad del nicotinamida-adenfn-dinucleótido, se comprobó que existe poca cooperación entre NADPH y ADP, mientras que el  $\text{NAD}^+$  fué totalmente inefectivo.

### 1.3.2. *Inactivación reversible de la nitrato reductasa por la acción conjunta de NADH y ADP*

La Figura 10 muestra también que, bajo las condiciones experimentales elegidas, la inactivación de la nitrato reductasa por NADH depende de la presencia simultánea de ADP, confirmando los resultados que acabamos de describir. El ADP sólo no fué efectivo. La nitrato reductasa inactivada por NADH y ADP puede convertirse en su forma activa por reoxidación con ferricianuro (Tabla X).

A fin de explorar si el efecto potenciador producido por el ADP sobre la inactivación de la nitrato reductasa pudiese estar relacionado con que dicho nucleótido complejase algún metal del enzima, se ensayaron algunos

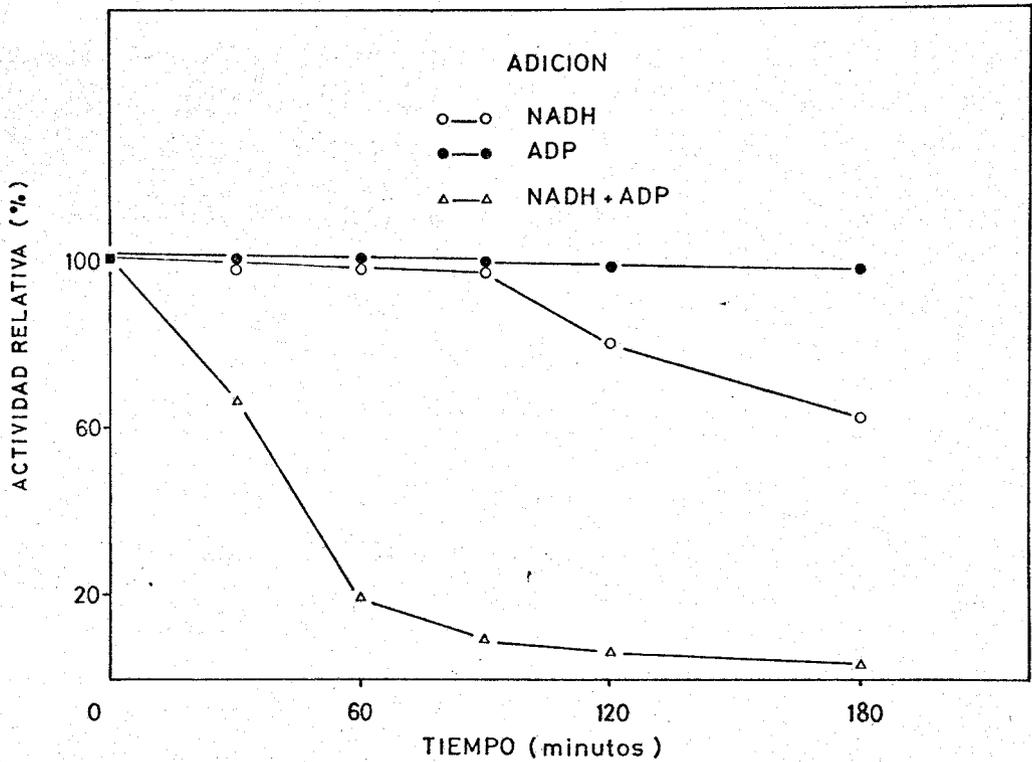


Fig. 10. Cinética de la inactivación de la nitrato reductasa de *Chlorella* por NADH y ADP. El enzima parcialmente purificado (3 mg) se preincubó a 0°C, en un volumen de 1 ml, con 200  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5; NADH 0,3 mM y (ó) ADP 0,3 mM. A los tiempos indicados, las actividades de NADH-nitrato reductasa se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas de preincubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición a tiempo cero.

TABLA X

REACTIVACION POR FERRICIANURO DE LA NITRATO REDUCTASA DE  
Chlorella INACTIVADA POR NADH Y ADP

Adición	Actividad relativa (%)	
		Tratada con $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-*}$
Ninguna	100	100
NADH	78	104
ADP	102	94
NADH + ADP	16	110

Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la Tabla IX. Enzima parcialmente purificado, 2,3 mg.

\* Las mezclas se incubaron con ferricianuro potásico 0,3 mM durante 2 minutos a 0°C antes del ensayo de la actividad.

TABLA XI

EFFECTO DEL ADP Y DE AGENTES COMPLEJANTES DE METALES SOBRE LA  
INACTIVACION POR NADH DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

---

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	100
NADH	85
NADH + ADP	16
NADH + EDTA	96
NADH + P <sub>i</sub>	88

---

Las condiciones experimentales fueron las mismas que en la  
Tabla IX. EDTA, 5 mM; P<sub>i</sub>, 0,2 M.

agentes complejantes de metales. Como se puede ver en la Tabla XI, ni el EDTA ni el fosfato inorgánico potenciaron la inactivación de la nitrato reductasa. Por otro lado, la presencia de  $Mg^{++}$  (5 mM) no afectó en absoluto al grado de inactivación producido por NADH y ADP.

### 1.3.3. *Protección por nitrato y diferentes inhibidores competitivos de la nitrato reductasa contra su inactivación por NADH y ADP*

La Figura 11 muestra el efecto del nitrato sobre la inactivación de la nitrato reductasa por NADH y ADP. Se observa que el nitrato, oxidante fisiológico del enzima, protege a éste totalmente de su inactivación por la acción cooperativa de ambos nucleótidos. El efecto protector del nitrato podría deberse a que impide la reducción del enzima necesaria para que ocurra la inactivación.

La azida, el carbamil-fosfato y el cianato son inhibidores competitivos, con respecto al nitrato, de la nitrato reductasa de plantas superiores y algas verdes (15,21). Era pues interesante estudiar el efecto de estos compuestos sobre la inactivación que el NADH y el ADP ejer-

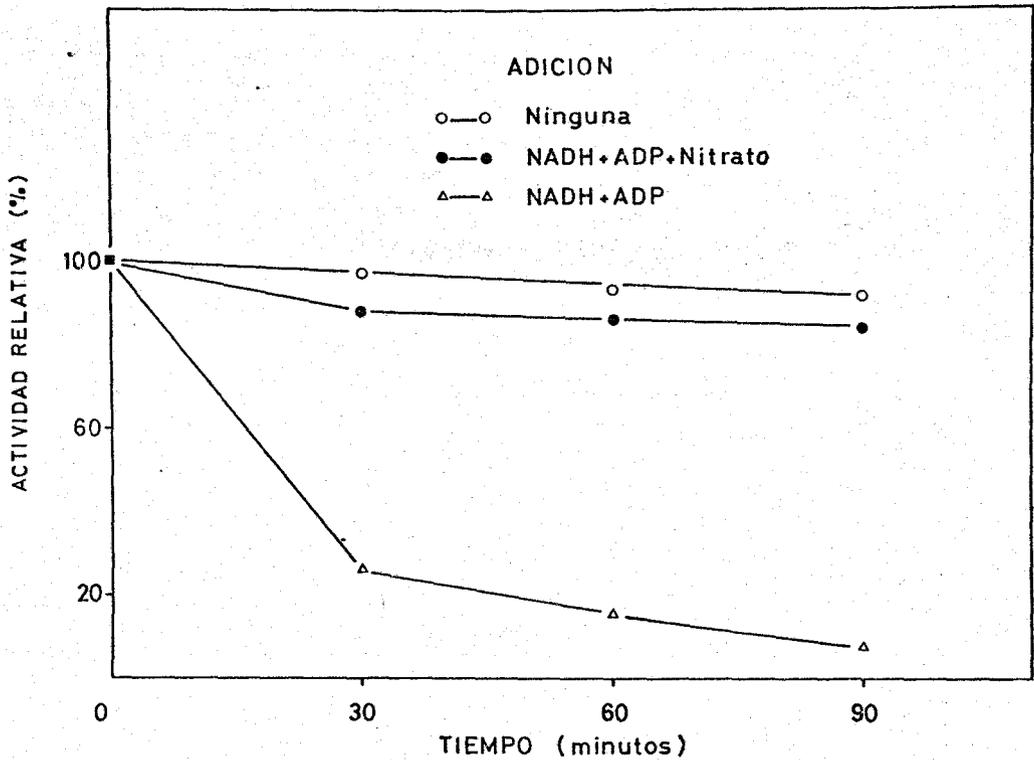


Fig. 11. *Protección por nitrato contra la inactivación por NADH y ADP de la nitrato reductasa de Chlorella*. Las condiciones experimentales fueron similares a las de la Figura 10. En la mezcla de preincubación que contenía nitrato (10 mM), el NADH fué oxidado progresivamente por el enzima, pero se comprobó que al final del periodo de preincubación aproximadamente la mitad del piridín-nucleótido permanecía aún reducido.

TABLA XII

PROTECCION POR DIFERENTES INHIBIDORES COMPETITIVOS DE LA  
NITRATO REDUCTASA DE Chlorella CONTRA SU INACTIVACION  
POR NADH Y ADP

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	100
NADH	60
ADP	109
NADH + ADP	16
NADH + ADP + Azida	85
NADH + ADP + Carbamil-fosfato	91
NADH + ADP + Cianato	68

El enzima parcialmente purificado (2,5 mg) se preincubó durante 2 horas a 0°C, en un volumen de 1 ml, con 200 µmoles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y los nucleótidos e inhibidores indicados. Las actividades de NADH-nitrato reductasa se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas de preincubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición. NADH, ADP, carbamil-fosfato y cianato, 0,3 mM; azida, 8 µM.

cen sobre el enzima. Los experimentos que recoge la Tabla XII demuestran que estos tres inhibidores protegen contra la inactivación de la nitrato reductasa, comportándose a este respecto de forma análoga a como lo hace el nitrato.

El hecho de que estos inhibidores competitivos -que no son aceptores de electrones del NADH en la reacción catalizada por la nitrato reductasa- protejan al enzima de la inactivación, sugiere, o bien que en dichas condiciones no puede reducirse el sitio que implica la inactivación, o bien que, aunque la reducción de tal sitio se produzca no tiene lugar el cambio de conformación que conduce a la inactivación.

#### 1.3.4. *Efecto de la concentración de ADP sobre la inactivación de la nitrato reductasa por NADH y ADP*

Los resultados recogidos en la Figura 12 muestran que cuando la nitrato reductasa se preincubó con NADH y concentraciones crecientes de ADP, el mayor grado de inactivación se logró a una concentración 0,3 mM de ADP, equimolecular con la de NADH usada. A concentraciones más altas (1 y 3 mM) el ADP no afectó a la actividad enzimática.

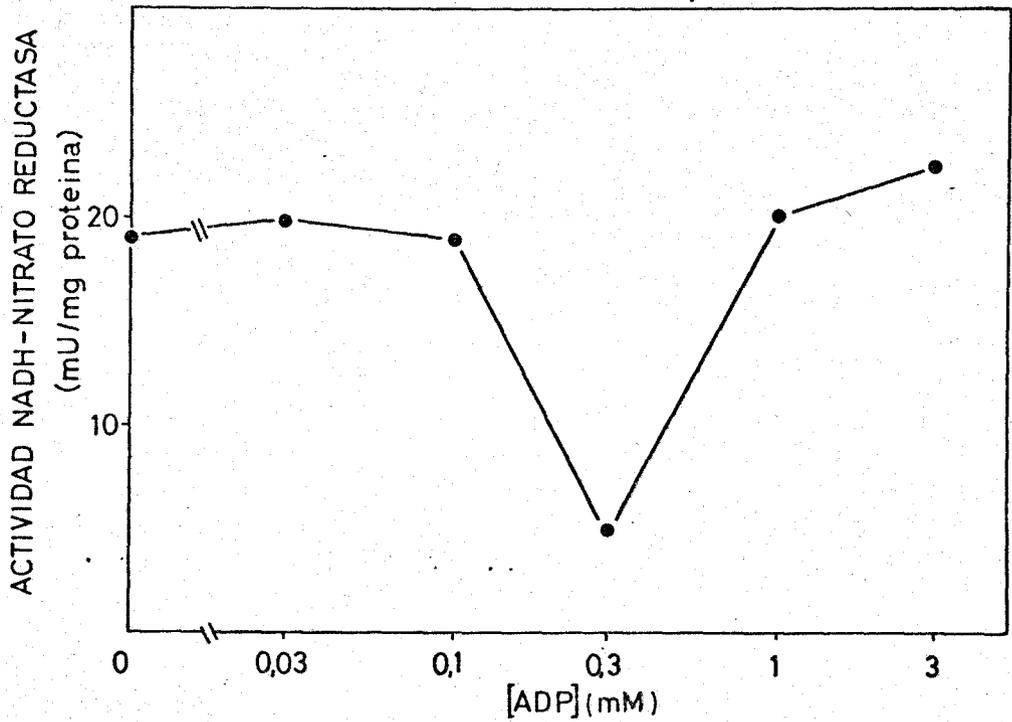


Fig. 12. Efecto de la concentración de ADP sobre la inactivación de la nitrato reductasa de *Chlorella* por NADH y ADP. El enzima parcialmente purificado se preincubó durante 1 hora a temperatura ambiente, en un volumen de 1 ml, con 200  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5, 0,3  $\mu$ moles de NADH y ADP a las concentraciones indicadas. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas.

### 1.3.5. Efecto protector de diversos nucleótidos contra la inactivación de la nitrato reductasa por NADH

En el experimento anterior se observó que el ADP a concentración de 3 mM no sólo no tenía efecto cooperativo con el NADH sobre la inactivación de la nitrato reductasa, sino que incluso el enzima presentaba mayor actividad que cuando se preincubaba con NADH sólo. Los resultados de la Tabla XIII muestran que si el enzima se preincuba a temperatura ambiente durante 1 hora con NADH 0,3 mM y diversos nucleótidos cada uno a la concentración de 3 mM, estos protegen de manera inespecífica contra la inactivación producida por el NADH. El  $\text{NADP}^+$  fué el más efectivo de todos.

Es interesante, pues, resaltar que, a baja concentración, el ADP potencia específicamente la inactivación por NADH de la nitrato reductasa, mientras que, cuando se aumenta la concentración de los nucleótidos a 3 mM, todos ellos protegen en mayor o menor grado contra la inactivación producida por el NADH.

TABLA XIII

PROTECCION POR DIVERSOS NUCLEOTIDOS CONTRA LA INACTIVACION  
 POR NADH DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	100
NADH	8
NADH, ATP	40
NADH, ADP	59
NADH, AMP	33
NADH, XMP	49
NADH, NAD <sup>+</sup>	49
NADH, NADP <sup>+</sup>	86

El enzima parcialmente purificado (2 mg) se preincubó durante 1 horas a temperatura ambiente, en un volumen de 1 ml, con 200  $\mu$ moles de tampón de Tris-ClH, pH 7,5, 0,3 moles de NADH y los nucleótidos indicados a la concentración de 3 mM cada uno. Las actividades de NADH-nitrato reductasa se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición a tiempo cero.

## 2. REGULACION DE LA ACTIVIDAD NADH-DIAFORASA DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca

La NADH-diaforasa es la actividad inicial de las dos que, secuencialmente, transfieren los electrones desde el NADH al nitrato en la nitrato reductasa de Chlorella. Puede usar una variedad de compuestos oxidados (tales como el citocromo) como aceptores de electrones. Dicha actividad es sensible al tratamiento térmico y a los reactivos de grupos sulfhidrilos (5,15).

### 2.1. Inactivación de la diaforasa por tratamiento térmico

A 25°C, la NADH-diaforasa, que es sensible al calor, se protege por una variedad de nucleótidos piridínicos, flavínicos y adenínicos, y a 45°C, específicamente por el flavín-adenín-dinucleótido.

#### 2.1.1. *Protección por diversas coenzimas contra la inactivación a 25°C y 45°C*

La Tabla XIV muestra que la forma reducida (NADH) y oxidada (NAD<sup>+</sup>) del nicotinamida-adenín-dinucleótido, así

TABLA XIV

PROTECCION POR DISTINTOS COENZIMAS CONTRA LA INACTIVACION  
 TERMICA A 25°C DE LA ACTIVIDAD DIAFORASICA DEL COMPLEJO  
 NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	1
FAD	227
FMN	113
NADH	160
FAD + NADH	264
NAD <sup>+</sup>	140
NADPH	10
NADP <sup>+</sup>	21
ATP	113
ADP	141
AMP	91
GDP	136
CDP	70
UDP	82
Adenosina	77
Guanosina	50
Citidina	53

El enzima parcialmente purificado (0,5 mg) se preincubó durante 90 min a 25°C, en un volumen de 0,5 ml, con 150  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y los coenzimas indicados a la concentración de 0,3 mM cada uno. Al final del periodo de preincubación, se completaron las mezclas hasta un volumen final de 2 ml con los reactivos del ensayo standard. Las actividades de NADH-diaforasa se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición a tiempo cero.

TABLA XV

PROTECCION ESPECIFICA POR EL FAD CONTRA LA INACTIVACION  
 TERMICA A 45°C DE LA ACTIVIDAD DIAFORASICA DEL COMPLEJO  
 NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	2
FAD	200
FMN	17
NADH	2
FAD + NADH	182
NAD <sup>+</sup>	9
NADPH	2
NADP <sup>+</sup>	5
ATP	6
ADP	9
AMP	6
GDP	5
CDP	5
UDP	9
Adenosina	6
Guanosina	5
Citidina	6

El enzima se preincubó con los coenzimas indicados durante 5 min a 45°C. Las demás condiciones experimentales fueron las mismas que en la Tabla XIV.

como los nucleótidos flavínicos (FAD y FMN) y una serie de nucleósidos púricos y pirimídicos mono-, di- y tri-fosforilados protegen (e incluso activan) la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella contra la inactivación térmica a 25°C. Los nucleósidos (adenosina, guanosina y citidina) previenen también contra esta inactivación, pero en menor grado, y tanto el NADP<sup>+</sup> como el NADPH son totalmente inefectivos.

Cuando la temperatura es más alta (45°C), sólo el FAD protege específicamente contra la inactivación térmica (Tabla XV). Esto confirma que dicho coenzima es esencial en la actividad diaforásica del complejo enzimático (5).

#### 2.1.2. *Efecto de distintos inhibidores competitivos respecto al nitrato*

Los resultados anteriores (apartado 1.3.3.) pusieron de manifiesto que tanto el nitrato como diferentes inhibidores competitivos de la nitrato reductasa terminal, eran eficaces protectores contra la inactivación del enzima por NADH y ADP. Sin embargo, los resultados recogidos en la

TABLA XVI

EFFECTO DEL NITRATO Y DIFERENTES INHIBIDORES COMPETITIVOS DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella CONTRA LA INACTIVACION TERMICA DE SU ACTIVIDAD DIAFORASICA

Adición	Concentración ( $\mu$ M)	Actividad relativa (%)	
		25°C	45°C
Ninguna	--	1	2
FAD	300	227	200
Nitrato	10.000	1	3
Azida	10	2	6
Cianato	20	1	4
Carbamil-fosfato	300	1	7

El enzima parcialmente purificado (0,6 mg) se preincubó durante 90 min a 25°C ó, alternativamente, durante 5 min a 45°C, en un volumen de 0,5 ml, con 150  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y nitrato ó cada uno de los inhibidores a la concentración expresada. Las restantes condiciones experimentales fueron las mismas que en la Tabla XIV.

Tabla XVI muestran que ni el nitrato ni los inhibidores competitivos son capaces de proteger a la NADH-diaforasa contra la inactivación térmica, tanto a 25°C como a 45°C.

### 2.1.3. *Cinética de la protección de la NADH-diaforasa por NADH y por ADP*

La Figura 13 muestra la inactivación con el tiempo de la NADH-diaforasa por tratamiento térmico, así como el efecto que el NADH y el ADP tienen sobre esta inactivación. Como se puede ver, la diaforasa se inactiva de forma gradual. Si el NADH se encuentra presente en la mezcla de preincubación, no sólo impide la inactivación del enzima sino que además produce una estimulación de la actividad diaforásica inicial. Dicha estimulación tiene lugar durante la primera hora de preincubación, para llegar luego a un nivel de actividad prácticamente constante. El ADP protege totalmente contra la inactivación pero, a diferencia del NADH, produce una escasa estimulación de la actividad de diaforasa.

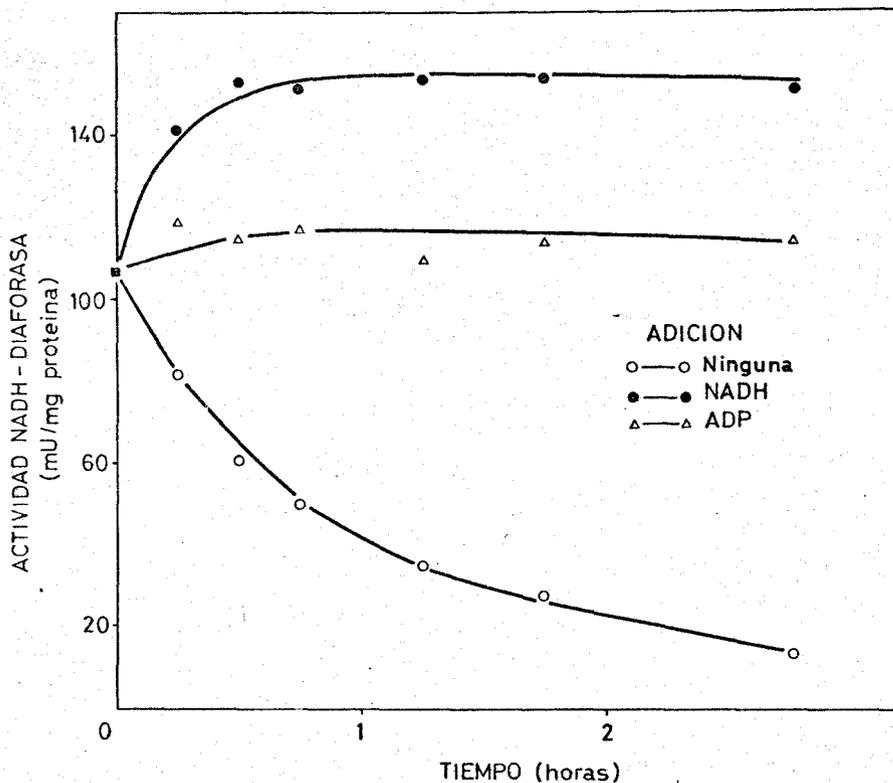


Fig. 13. Cinética de protección por el NADH y el ADP contra la inactivación térmica a 25°C de la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. El enzima parcialmente purificado (4 mg) se preincubó a temperatura ambiente, en un volumen de 1 ml, con 200  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y NADH (0,3 mM) ó (ADP 0,3 mM). A los tiempos indicados, las actividades de NADH-diaforasa se determinaron en alícuotas de 0,1 ml tomadas de las correspondientes mezclas y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición a tiempo cero.

#### 2.1.4. Efecto de diferentes concentraciones de NADH

La Figura 14 presenta la cinética de la protección por distintas concentraciones de NADH contra la inactivación térmica a 25°C de la NADH-diaforasa. Se puede observar que entre los márgenes de 0,01 mM y 1 mM cualquier concentración de NADH fué efectiva. Además, todas ellas presentan efecto estimulante sobre la actividad diaforásica. No obstante, a concentración más baja (0,001 mM) el NADH es incapaz de proteger eficazmente al enzima contra su inactivación térmica, si bien durante la primera hora de preincubación estimula algo su actividad original.

En la Figura 15 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de NADH sobre la actividad diaforásica después de 90 minutos de preincubación a 25°C. Se puede apreciar que, en las condiciones experimentales elegidas, la protección es total a partir de una concentración 0,02 mM de NADH. A concentraciones superiores a 0,1 mM, el NADH llega a reactivar casi tres veces la actividad inicial del enzima.

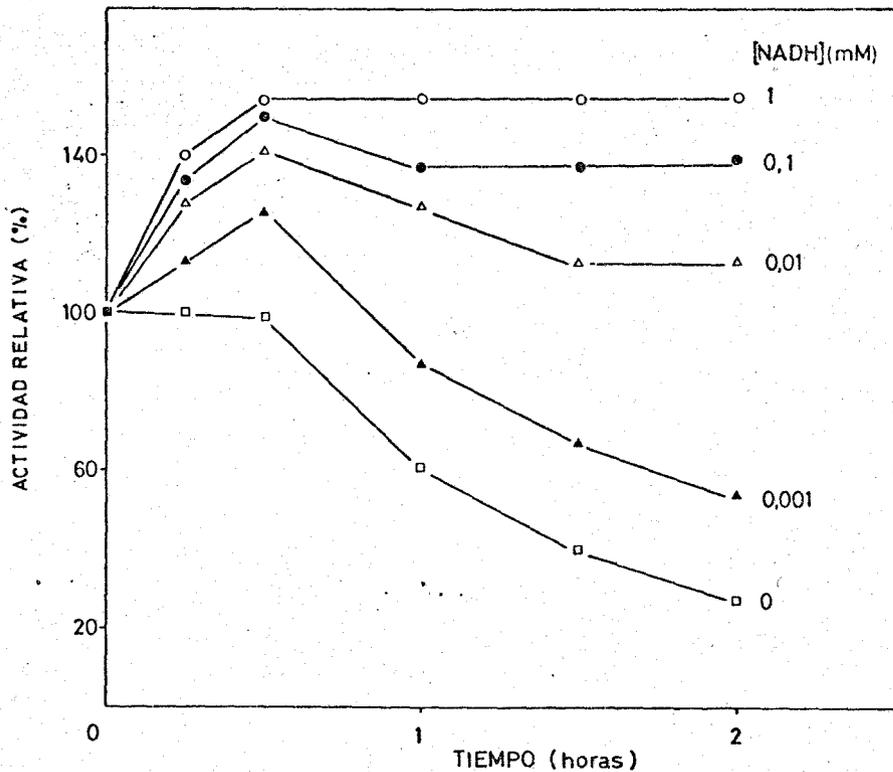


Fig. 14. Cinética de la protección por distintas concentraciones de NADH contra la inactivación térmica a 25°C de la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. El enzima parcialmente purificado (1,5 mg) se preincubó a 25°C en un volumen de 1 ml, con 300  $\mu$ moles de tampón Tris-CIH, pH 7,5 y NADH a las concentraciones indicadas. Las restantes condiciones experimentales fueron las mismas de la Figura 13.

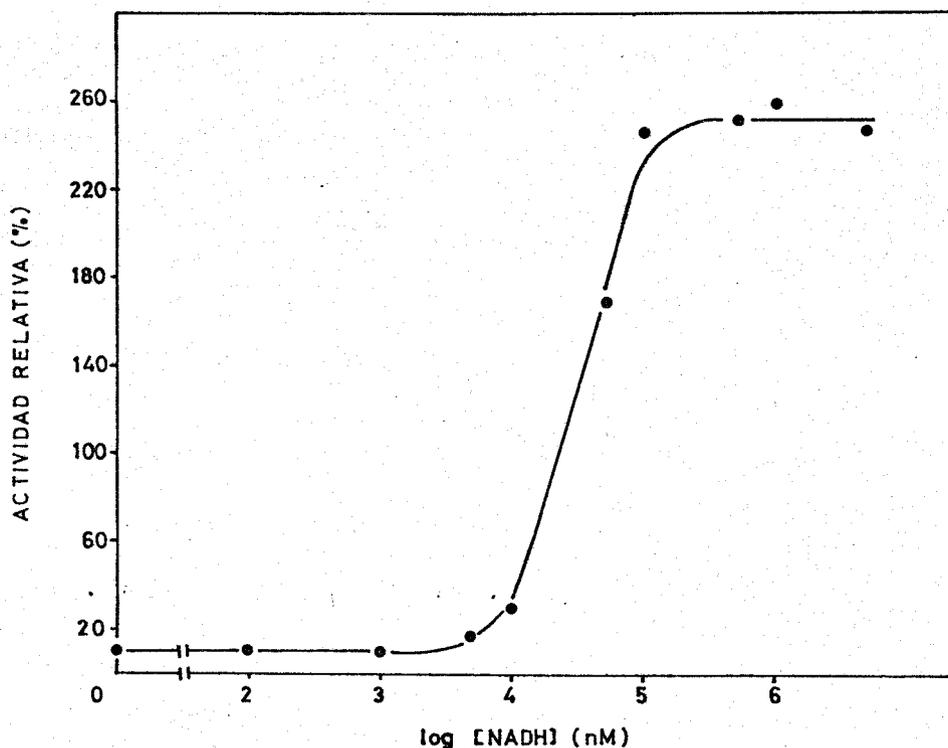


Fig. 15. Efecto de distintas concentraciones de NADH contra la inactivación térmica a 25°C de la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. El enzima parcialmente purificado (0,4 mg) se preincubó durante 90 min a 25°C, en un volumen de 1 ml, con 200  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y NADH a las concentraciones indicadas. Al final del período de preincubación, se completaron las mezclas hasta un volumen final de 2 ml, con los reactivos del ensayo standard. Las actividades de NADH-diaforasa se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición a tiempo cero.

### 2.1.5. Efecto de diferentes concentraciones de $\text{NAD}^+$

Cuando se ensayaron diferentes concentraciones de  $\text{NAD}^+$ , en vez de NADH, se obtuvo la curva que muestra la Figura 16. La concentración de  $\text{NAD}^+$  necesaria para conseguir una protección total de la diaforasa es del orden de 0,2 mM, diez veces superior a la que se necesitó de NADH para obtener el mismo efecto. A partir de una concentración 0,3 mM de  $\text{NAD}^+$ , el nivel de actividad se estabiliza en un valor ligeramente superior al original.

### 2.1.6. Efecto de diferentes concentraciones de ADP

Se llevó a cabo el mismo estudio que en los dos casos anteriores pero utilizando ADP. Los resultados, representados gráficamente en la Figura 17, muestran una gran similitud con los obtenidos cuando se usó  $\text{NAD}^+$ .

### 2.1.7. Reactivación por NADH de la actividad diaforásica

De los resultados previamente presentados se puede concluir que el NADH, además de proteger contra la inactivación térmica de la NADH-diaforasa, produce una reactivación bastante apreciable de dicha actividad. La

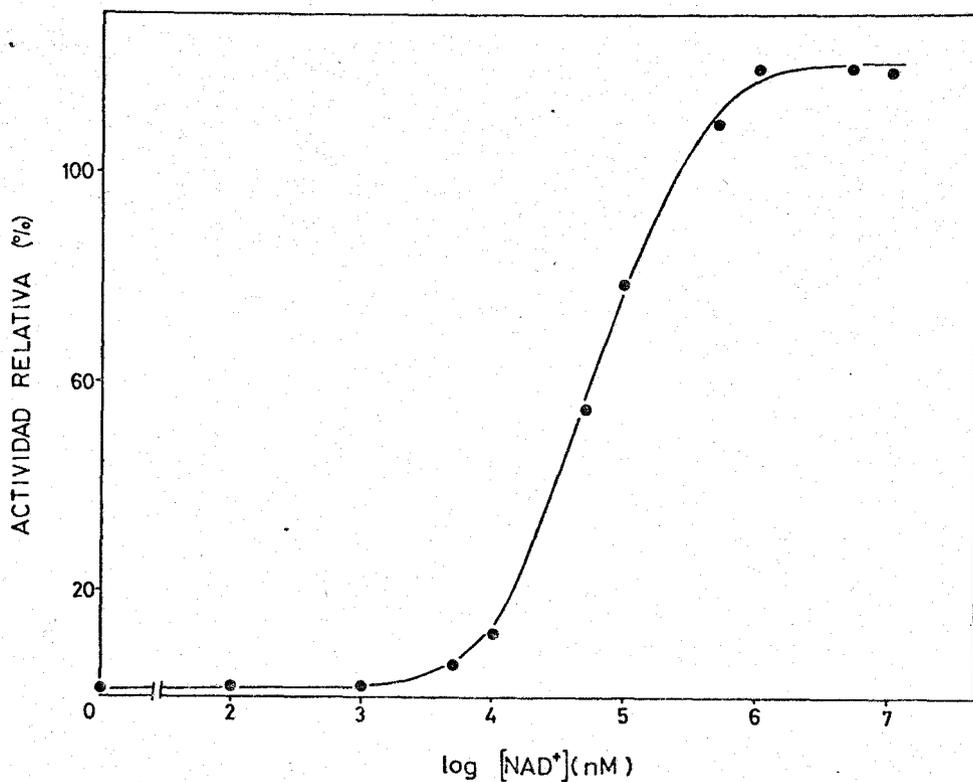


Fig. 16. Efecto de distintas concentraciones de  $\text{NAD}^+$  contra la inactivación térmica a  $25^{\circ}\text{C}$  de la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. Las condiciones fueron las mismas que las de la Figura 15, excepto que el NADH se substituyó por  $\text{NAD}^+$ . Preparación enzimática, 0,3 mg.

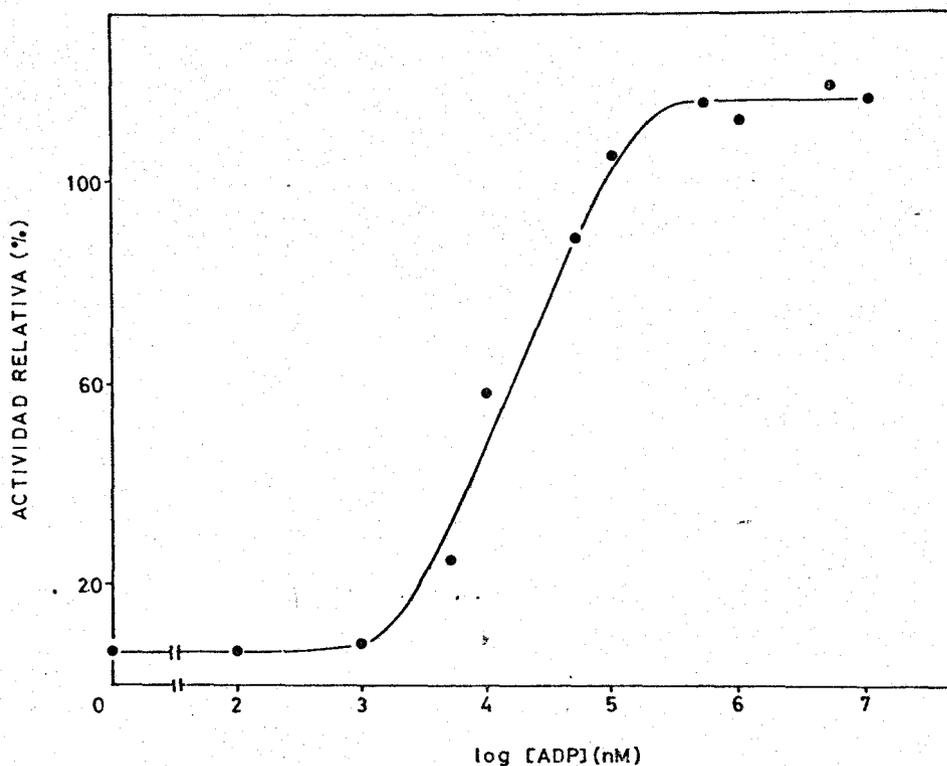


Fig. 17. Efecto de distintas concentraciones de ADP contra la inactivación térmica a 25°C de la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. Las condiciones experimentales fueron idénticas a las de la Figura 15, excepto que el NADH se sustituyó por ADP. Preparación enzimática, 0,3 mg.

Figura 18 muestra que si dicho nucleótido se añade cuando la diaforasa se encuentra parcialmente inactiva, es capaz de elevar su actividad prácticamente hasta su valor original.

#### 2.1.8. Efecto del FAD y NADH contra la inactivación de la NADH-diaforasa a diferentes temperaturas

Como muestran los resultados recogidos en las Tablas XIV y XV, la NADH-diaforasa se protege inespecíficamente por una variedad de coenzimas contra su inactivación térmica a 25°C; por el contrario, si la temperatura de tratamiento se aumenta hasta 45°C, es el FAD el único capaz de proteger.

En la Figura 19 se compara el efecto protector del NADH y del FAD contra la inactivación térmica del enzima a diferentes temperaturas. Se observa que el NADH ejerce su efecto protector hasta una temperatura de 35°C, a partir de la cual deja de ser efectivo, mientras que el FAD mantiene específicamente su efecto hasta temperaturas de 50°C.

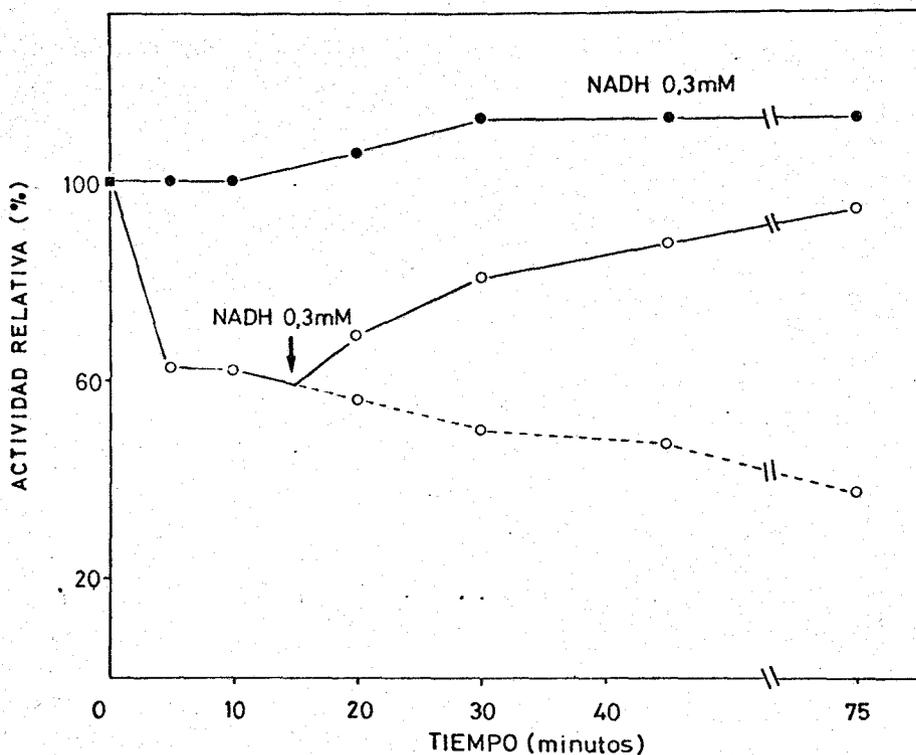


Fig. 18. Reactivación por NADH de la actividad diaforásica del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. El enzima parcialmente purificado (3,5 mg) se preincubó a 25°C, en un volumen de 1 ml, con 200  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y NADH (0,3 mM). Al tiempo indicado por la flecha, la mezcla que no llevaba NADH se dividió en dos fracciones a una de las cuales se le añadió el piridín-nucleótido (o - o). Las restantes condiciones fueron las mismas que en la Figura 13.

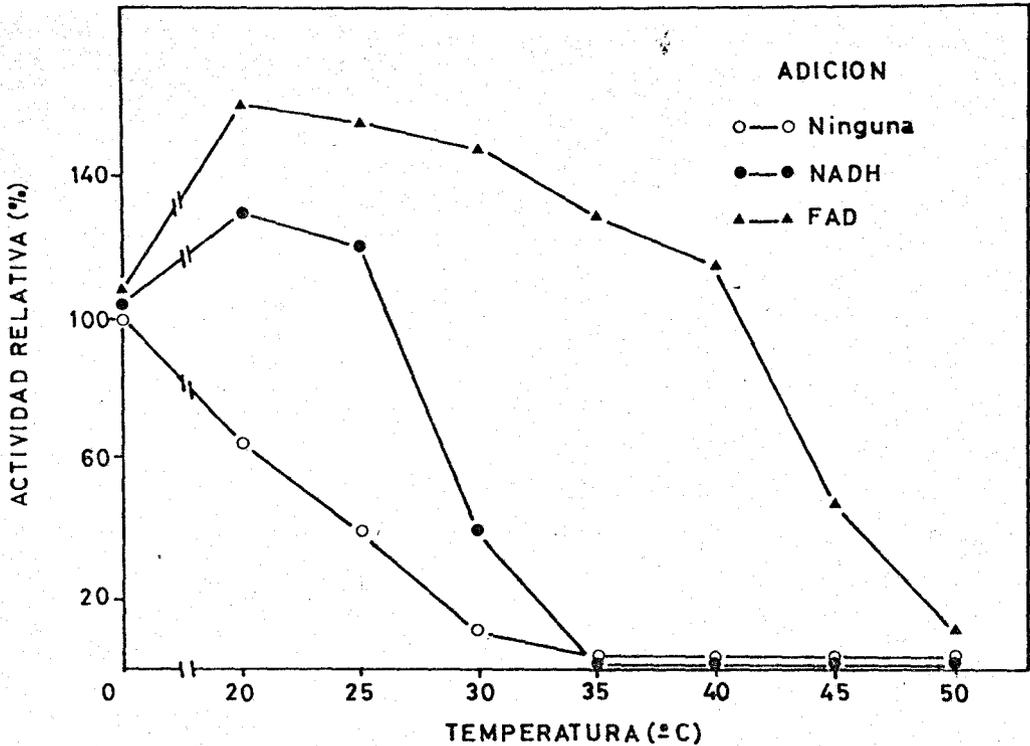


Fig. 19. Protección por FAD y NADH contra la inactivación térmica a diferentes temperaturas de la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*. El enzima parcialmente purificado (0,2 mg) se preincubó durante 10 min a las temperaturas indicadas, en un volumen de 0,5 ml, con 200  $\mu$ moles de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y NADH (0,3 mM) ó FAD (0,3 mM). Al final del periodo de preincubación, las mezclas se completaron, hasta un volumen final de 2 ml, con los reactivos del ensayo standard. Las actividades de NADH-diaforasa se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición a 0°C.

## 2.2. Inactivación de la NADH-diaforasa por p-hidroximercuri- benzoato

### 2.2.1. *Efecto de diversos sustratos y coenzimas*

La Tabla XVII muestra que el p-HMB (reactivo de grupos sulfhídricos) produce una inactivación prácticamente total de la NADH-diaforasa. Como se puede apreciar en la misma Tabla, esta inactivación se puede proteger cuando se preincuba el enzima en presencia de NADH ó FAD. El  $\text{NAD}^+$  es incapaz de ejercer efecto protector alguno, y el otro piridin-nucleótido reducido (NADPH) es, también, prácticamente inefectivo. El ADP y el nitrato tampoco protegen contra la inactivación por p-HMB.

Es de resaltar que el NADH (sustrato del enzima) protege más específicamente que el FAD contra la inactivación por p-HMB.

TABLA XVII

EFFECTO DE DIVERSOS SUSTRATOS Y COENZIMAS SOBRE LA INACTIVACION POR p-HMB DE LA ACTIVIDAD DIAFORASICA DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Sistema de preincubación	Concentraciones ( $\mu\text{M}$ )		Actividad relativa (%)
	<u>p</u> -HMB	Sustratos y coenzimas	
Ninguno	-	-	100
<u>p</u> -HMB	1,1	-	2
<u>p</u> -HMB, NADH	1,1	166	70
<u>p</u> -HMB, $\text{NAD}^+$	1,1	166	1
<u>p</u> -HMB, NADPH	1,1	166	10
<u>p</u> -HMB, $\text{NADP}^+$	1,1	166	3
<u>p</u> -HMB, FAD	1,1	166	29
<u>p</u> -HMB, ADP	1,1	166	1
<u>p</u> -HMB, $\text{NO}_3^-$	1,1	5.555	4

0,6 mg de enzima parcialmente purificado se preincubaron, en un volumen de 1,8 ml, con 200  $\mu\text{moles}$  de tampón Tris-ClH, pH 7,5 y cada uno de los sustratos y coenzimas arriba descritos a la concentración indicada. Después de 7 min a temperatura ambiente, las mezclas de reacción se completaron hasta un volumen final de 2 ml con los reactivos del ensayo standard. Las actividades de NADH-diaforasa se expresan como tantos por ciento de la del control sin adición.

#### **IV. DISCUSSION**

Exceptuando aquellas especies que directamente -como las algas verde-azuladas- o por asociación simbiótica con bacterias -como las leguminosas- fijan el nitrógeno atmosférico, las plantas utilizan predominantemente nitrato como fuente de nitrógeno. Para que las plantas puedan sintetizar compuestos orgánicos nitrogenados; han de reducir, primeramente, el nitrato hasta amoniaco, forma en que el nitrógeno se incorpora en los aminoácidos, los precursores de las sustancias más características de la materia viva: proteínas y ácidos nucleicos. Los compuestos nitrogenados sintetizados por las plantas sirven a su vez, posteriormente, de fuente de nitrógeno para el reino animal. Es por ello por lo que el mecanismo de asimilación del nitrato constituye uno de los procesos fundamentales del mundo vivo. Es lógico pensar que una ruta asimilatoria de tal importancia deba de estar controlada en la célula por unos mecanismos de regulación muy eficaces que aseguren su economía tanto de energía como de materiales.

Las investigaciones y resultados que se recogen

en el presente trabajo han arrojado nueva luz sobre el mecanismo de regulación del complejo NADH-nitrato reductasa tanto a nivel fisiológico como a nivel bioquímico.

El amoníaco, producto final de la ruta catalizada por el sistema reductor de nitrato, es un represor nutricional de los dos enzimas que constituyen dicho sistema, es decir, la nitrato reductasa y la nitrito reductasa. LOSADA y col. (40) han demostrado que el amoníaco reprime a todo el sistema reductor de nitrato de Chlorella fusca, ya que si se añade amoníaco a un cultivo del alga creciendo en la luz, los valores de la nitrato y la nitrito reductasas, así como de la diaforasa, desciende notablemente al cabo de unas 12 horas de crecimiento. La posterior eliminación del amoníaco del medio causa un aumento en el nivel de los enzimas del sistema reductor de nitrato. Esta recuperación se inhibe por la presencia de cicloheximida en el medio de cultivo, lo cual indica que se requiere para ella la síntesis de novo de estas proteínas.

El amoníaco, además, es capaz de ejercer otro tipo de control, mucho más rápido sobre el sistema reductor de nitrato. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio habfan puesto de manifiesto que, tanto en Chlorella (2,40,43) como en Chlamydomonas (41,72,86) la presencia de amoníaco en el medio de cultivo provoca, en un tiempo relativamente corto, la inactivación reversible de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa sin afectar a la actividad de la diaforasa ni de la de nitrito reductasa. Un efecto semejante del amoníaco sobre la nitrato reductasa del alga unicelular Cyanidium caldarium ha sido encontrado por RIGANO (48).

A nivel subcelular, se habfa demostrado que la nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardi se inactiva in vitro al preincubar el enzima con NADH siendo el proceso reversible, ya que el posterior tratamiento con ferricianuro potásico del enzima inactivado devuelve al mismo su actividad original (41,44). MORENO y col. (45), en el enzima de Chlorella, han encontrado que la velocidad de inactivación por dicho piridín-nucleótido aumenta con el pH y que dicha inactivación puede ser protegida e incluso revertida por nitrato. El grupo de VENNESLAND (52,54)

ha encontrado que el NADH y el NADPH producen la inactivación de la nitrato reductasa del alga verde Chlorella vulgaris y que la activación de la forma inactiva del enzima requiere la presencia de un agente oxidante.

Los resultados que nosotros hemos obtenidos ahora ponen de manifiesto que la nitrato reductasa de Chlorella fusca también se inactiva in vitro cuando el enzima se preincuba con los piridin-nucleótidos reducidos (Tabla I y Figura 1). El hecho de que los piridin-nucleótidos oxidados ( $\text{NAD}^+$  y  $\text{NADP}^+$ ) no sean capaces de ejercer efecto alguno sobre la actividad enzimática, parece indicar que la inactivación del enzima es consecuencia de su reducción por NAD(P)H. Este punto queda claramente confirmado porque el enzima inactivado se puede reactivar, de forma casi instantánea, por oxidación con ferricianuro. La nitrato reductasa en su forma inactiva también puede activarse por la presencia de otro oxidante como el DPIP (Figura 2).

GARRET Y GREENBAUM (82), en sus estudios sobre la nitrato reductasa de Neurospora crassa, han sugerido que, siendo el ferricianuro un aceptor de electrones de la mi-

tad diaforásica, su mecanismo de acción puede deberse a que oxida al enzima inactivo a través de la diaforasa. Nuestros resultados (Tabla II) no están de acuerdo con lo expuesto por estos autores, ya que la nitrato reductasa en su forma inactiva y carente, además, de actividad diaforásica es susceptible de convertirse en su forma activa por tratamiento con ferriélanuro, lo cual sugiere que la acción de dicho oxidante pueda tener lugar directamente sobre la actividad FMH<sub>2</sub>-nitrato reductasa y no a través de la NADH-diaforasa.

La nitrato reductasa puede, pues, existir in vitro en dos formas interconvertibles: una activa y oxidada y otra inactiva y reducida. La conversión in vitro de la forma activa de la nitrato reductasa en la forma inactiva se puede conseguir reduciendo el enzima con NADH, en un proceso cuya velocidad es proporcional a la concentración de piridín-nucleótido. La transformación es reversible, y el enzima inactivado in vitro se puede convertir de nuevo en su forma activa por reoxidación con ferriclanuro o DPIP. Como discutiremos seguidamente, el mecanismo de interconversión de la nitrato reductasa

puede desempeñar un papel de gran importancia en la regulación in vivo de este complejo enzimático.

El nitrato no es sólo la fuente principal de nitrógeno que utilizan las plantas, sino que su reducción y posterior asimilación están estrechamente relacionadas con las reacciones fotosintéticas. En efecto, fué WARBURG (87,88) el que hizo notar en varias ocasiones que dicho compuesto nitrogenado es el primer reactivo de Hill descubierto -es decir, un aceptor terminal de los electrones procedentes de la cadena de transporte no cíclica de la fotosíntesis-. La reducción fotoquímica de nitrato a nitrato y amoníaco está acoplada estequiométricamente con el desprendimiento de oxígeno y la formación de ATP (89,90). En el presente trabajo hemos podido poner de manifiesto que la regulación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella fusca esta íntimamente asociada con las reacciones fotosintéticas.

La adición de amoníaco a un cultivo de células de Chlorella creciendo en la luz con nitrato provoca la

Inactivación de la nitrato reductasa. Como el enzima se puede reactivar in vitro por reoxidación con ferricianuro (Figura 3), estos resultados sugieren que el amoniaco provoca in vivo la reducción del enzima y por consiguiente su inactivación. En apoyo de nuestra hipótesis está el hecho de que el amoniaco se comporta (83) como un desacoplante efectivo de la fosforilación fotosintética no cíclica, estimulando el flujo de electrones y, en consecuencia, aumentando, por un lado, el nivel de poder reductor dentro de la célula, y, por otro, los niveles de ADP. Otro desacoplante de la fotofosforilación no cíclica es el arseniato (83); su adición al medio de cultivo produce el mismo efecto que el amoniaco sobre la actividad de la nitrato reductasa de Chlorella (Figura 4).

La inactivación in vivo del enzima por desacoplamiento de la fotofosforilación no cíclica ha quedado demostrado todavía de forma más concluyente al usar como agente desacoplante la metilamina (84). Los resultados que se presentan (Figuras 5 y 6) muestran que la metilamina, al igual que el amoniaco y el arseniato, provoca la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa sin afectar a la mitad

diaforésica del complejo. Es de gran importancia hacer notar (Figura 7) que la metilamina no es utilizada como fuente de nitrógeno por las células de Chlorella, durante el período normal de tratamiento, por lo que su efecto sólo puede explicarse a través del desacoplamiento de la fotofosforilación no cíclica. El crecimiento observado a partir de las 40 horas de haberse puesto el cultivo en marcha pudo deberse a la acumulación progresiva de amoniaco que se detectó en el medio de cultivo después de ese período de tiempo. A este respecto hay que señalar que algunas bacterias no fotosintéticas son capaces de crecer en compuestos de un sólo carbono reducido como única fuente de energía. Concretamente ha sido descrita (91,92) una especie de Pseudomonas que utilice metilamina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía; este organismo elabora un enzima que cataliza una reacción entre metilamina y L-glutamato para formar un intermediario biológico desconocido en otros organismos, N-metilglutamato, y amoniaco. Es bastante probable que en nuestro cultivo de Chlorella con metilamina como fuente de nitrógeno, se desarrollase una población de bacterias semejantes y que, como consecuencia de la utilización por las mismas de este compuesto por la vía

descrita, excretasen al medio amoníaco, el cual pudo ser utilizado como fuente de nitrógeno por las células de Chlorella. De hecho, cuando el experimento se realizó en cultivos estériles -sin posibilidad por tanto de contaminación bacteriana- no hubo crecimiento en el cultivo de Chlorella con metilamina.

BASSHAM (60,85,93) ha estudiado exhaustivamente el metabolismo fotosintético del carbono en Chlorella pyrenoidosa, habiendo encontrado que en la luz se activan algunos enzimas del ciclo reductivo de asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$ , mientras que en la oscuridad -donde no hay flujo fotosintético de electrones- se activa el ciclo oxidativo de las pentosas-fosfato, concretamente la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa. La activación de este enzima también puede lograrse por la adición en la luz de vitamina  $\text{K}_5$ , lo cual -según el mismo autor- sugiere que los electrones procedentes del flujo fotosintético se desvían hacia la reducción de dicho compuesto, por lo que cesa la reducción de  $\text{NADP}^+$ . Así, la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa se activaría por el aumento en el nivel de  $\text{NADP}^+$ , uno de sus sustratos, que tiene lugar en la oscuridad.

Nosotros hemos encontrado que la adición de menadiona (vitamina  $K_3$ ) a un cultivo de Chlorella fusca en la luz evita que se produzca la inactivación de la nitrato reductasa por la acción del amoníaco (Tabla III), arseniato (Tabla IV) o metilamina (Tabla V). La presencia de la menadiona impide la acumulación de NAD(P)H en el interior de la célula y por tanto no se produce la reducción del enzima que determina su inactivación. La nitrato reductasa inactivada in vivo por la adición de la metilamina se reactiva rápidamente al eliminar dicho compuesto del medio, siendo dicha reactivación casi instantánea en presencia de menadiona (Figura 8). La explicación de estos resultados apoya nuestra hipótesis de trabajo: la menadiona fotooxidaría el poder reductor acumulado y por ello el enzima se reactivaría a una mayor velocidad. El hecho de que se requiera la luz (Tablas VI y VII) para que se produzca la inactivación de la nitrato reductasa por acción de los desacoplantes estudiados indica que el mecanismo de inactivación de este enzima está estrechamente ligado a las reacciones luminosas de la Fotosíntesis.

Otros resultados recogidos en el presente trabajo

(Tabla VIII y Figura 9) corroboran también nuestra hipótesis de que la nitrato reductasa de Chlorella se inactiva in vivo por aumento en el nivel de poder reductor. En efecto, si se elimina la aireación del cultivo, el enzima se inactiva rápidamente y si, posteriormente, se restablece de nuevo la aireación, el enzima se reoxida recobrando su actividad original. Se han encontrado efectos semejantes sobre la nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardi (44).

RIGANO ha encontrado que la nitrato reductasa del alga Cyanidium caldarium se inactiva reversiblemente por el amoniaco (48), sugiriendo que dicho efecto pudiera ser debido a una acción directa del amoniaco, ó a algún compuesto derivado del mismo, sobre el enzima (50,51). Nuestros resultados sugieren, por el contrario, que el amoniaco produce su efecto sobre la nitrato reductasa a través de un cambio indirecto en el sentido de que este derivado del nitrógeno inorgánico parece actuar como un desacoplante de la fotofosforilación, estimulando en consecuencia el flujo de electrones y aumentando el nivel de poder reductor en la célula. La inactivación del enzima no parece tampoco deberse a un compuesto derivado del amoniaco, ya que la metilamina, que no es metabolizable por las células

las de Chlorella, es capaz de producir el mismo efecto.

Varios autores han encontrado que el ADP inhibe la actividad de la nitrato reductasa de hojas de tomate (94) y de espinaca (95,96), habiéndose sugerido un posible control por mecanismos alostérico y cinético. Nuestro trabajo pone de manifiesto que el ADP -el otro producto de la acción desacoplante del amoniaco- potencia enormemente el grado de inactivación del NADH sobre la nitrato reductasa de Chlorella fusca (Figura 10), siendo el efecto cooperativo específico para ambos nucleótidos (Tabla IX). La concentración óptima de ADP para lograr una mayor velocidad de inactivación es equimolecular con la de NADH usada (Figura 12). La inactivación es de tipo reversible, ya que el enzima se puede convertir de nuevo en su forma activa por tratamiento con ferricianuro (Tabla X). Ni el EDTA ni el fosfato inorgánico potencian la inactivación por NADH de la nitrato reductasa (Tabla XI). Posiblemente el ADP se una a algún sitio de la molécula de enzima dando lugar a un cambio de conformación que favorece la reducción por el NADH del sitio que implica la inacti-

tivación, ó, alternativamente, el enzima reducido cambie su conformación hacia una forma más inactiva por la acción del ADP.

El nitrato (Figura 11) y la azida, cianato y carbamilo-fosfato (Tabla XII) -inhibidores competitivos estos últimos de la nitrato reductasa de plantas superiores y algas verdes (15,21)- protegen al enzima de Chlorella contra su inactivación por NADH y ADP. El efecto protector del nitrato podría deberse a que, como oxidante fisiológico de la nitrato reductasa, impide la reducción del enzima necesaria para que ocurra su inactivación. El hecho de que los inhibidores competitivos respecto al nitrato -que no son aceptores de electrones del NADH en la reacción catalizada por la nitrato reductasa- protejan al enzima de la inactivación sugiere o bien que en dichas condiciones no puede reducirse el sitio que implica la inactivación, o bien que aunque la reducción de tal sitio se produzca no tiene lugar el cambio de conformación que conduce a la inactivación.

De los resultados anteriormente expuestos, podemos concluir que la nitrato reductasa de Chlorella fusca se inactiva in vivo por todos aquellos tratamientos que hacen aumentar el nivel de poder reductor y disminuir la carga energética celular. El amoníaco, por tanto, inactiva al enzima como consecuencia de su acción desacoplante sobre la fotofosforilación no cíclica.

El grupo de BASSHAM ha encontrado un efecto regulador muy importante del amoníaco sobre el metabolismo del carbono, en células de Chlorella pyrenoidosa, a nivel de la reacción que convierte fosfoenolpiruvato en piruvato (85). Aunque estos autores han sugerido que este efecto es causado por una activación directa de la piruvato quinasa por el amoníaco, el fenómeno podría ser también interpretado como un resultado de la acción desacoplante antes descrita del amoníaco sobre la fotofosforilación, que conduciría a una caída en la carga energética de la célula y, en consecuencia, estimularía la velocidad de la reacción dependiente de ADP catalizada por la piruvato quinasa. El mismo grupo ha puesto de manifiesto (97) que la adición de amoníaco en la oscuridad causa una estimula-

ción de la actividad glucosa 6-fosfato deshidrogenasa mayor que la que ocurre cuando se apaga la luz, interpretando este efecto como consecuencia de un desacoplamiento parcial del flujo de electrones asociado con la fosforilación oxidativa que dá lugar a un aumento en las razones de  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$  y de  $\text{ADP}/\text{ATP}$ .

La carga energética -y el estado redox- de la célula parece también regular el proceso de fijación de  $\text{CO}_2$  en algunos de sus enzimas claves. Así, la actividad de la ribulosa 5-fosfato quinasa de Hydrogenomonas facilis se estimula por el NADH y por el ATP (67), mientras que el AMP la afecta en sentido negativo en extractos crudos de varios organismos fotosintéticos y quimiosintéticos (66, 98). MULLER y col. han encontrado que tanto el NADPH (63) como el ATP (99) causan un aumento en la actividad de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de  $\text{NADP}^+$  en cloroplastos de espinaca, sugiriendo que la acción estimulante de la luz sobre la actividad del enzima se debe al efecto que sobre dicha actividad tienen el NADPH y el ATP que se producen en las reacciones luminosas de la Fotosíntesis. La inhibición de la 3-fosfoglicerato quinasa por AMP, observada en extractos de Hydrogenomonas facilis

(100), y su activación por ATP, encontrada en cloroplastos de guisante (101), sugieren que este enzima también se encuentra sometido a un control energético.

En la segunda parte de nuestro trabajo nos hemos ocupado del estudio de la mitad NADH-diaforasa del complejo enzimático reductor de nitrato, prestando especial atención a los posibles mecanismos de la regulación de su actividad catalítica.

Como es sabido, la nitrato reductasa de plantas superiores (3,6) y algas fotosintéticas (7, 36) utilizan NADH como donador de electrones. El NADPH sólo es activo cuando el sistema reductor de nitrato se suplementa con flavín nucleótido y NADPH-diaforasa; el NADH, sin embargo, puede ser utilizado como donador de electrones sin la acción de otros enzimas o cofactores (3,6,7). La especificidad que exhibe la NADH-nitrato reductasa por el piridín-nucleótido cuando cataliza la reducción del nitrato es lógicamente la misma que muestra cuando actúa como diaforasa frente a otros aceptores de electrones (9). Esta especifi-

cidad por el NADH, frente al NADPH, parece ser norma general en las plantas con clorofila (2).

Se ha puesto de manifiesto en diferentes laboratorios (3,7,102-104) que la reducción de nitrato dependiente de NADH no requiere generalmente la adición de flavín-nucleótidos. Sin embargo, ZUMFT (5,7) mostró en Chlorella fusca que después de someter el enzima a filtración en gel de agarosa se pierde la actividad dependiente de NADH y que dicha actividad se puede restaurar, de forma muy considerable, por adición de cantidades mínimas de FAD a la mezcla de ensayo. El mismo requerimiento de FAD se había observado (18) en la nitrato reductasa de soja después de dos precipitaciones con sulfato amónico.

DOWNEY (105) ha observado espectrofotométricamente la reducción de un compuesto flavínico en la NADPH-nitrato reductasa de Aspergillus al incubar con NADH y una posterior reoxidación al añadir nitrato, sugiriendo que el enzima es una flavoproteína. Sin embargo, VENNESLAND y JETSCHMANN (52) intentaron sin éxito identificar el FAD como grupo prostético de la nitrato reductasa, tratando de separar la flavina del apoenzima. Los espectros de absor -

ción de preparaciones altamente purificadas de nitrato reductasa de diversos orígenes (9,106) no han mostrado indicación alguna de bandas de absorción de nucleótidos flavínicos sino más bien una absorción generalizada a lo largo de toda la zona visible con un hombro alrededor de 410 nm.

Se ha demostrado que el calor inactiva completamente a la mitad diaforásica del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella (5), Chlamydomonas (23) y espinaca (21), y que dicha inactivación se puede prevenir si el tratamiento se efectúa en presencia de cantidad mínima de FAD, siendo el FMN totalmente inefectivo. Estos resultados han permitido sugerir que la nitrato reductasa de las anteriores fuentes es una flavoproteína. KAPLAN y col. (107) observaron que una NAD(P)H-diaforasa de Clostridium Kluyveri, que contiene FMN como grupo prostético, se puede proteger contra su inactivación térmica por NADH, NADPH ó FMN, pero no por  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADP}^+$  ó FAD.

En el presente trabajo se muestra (Tabla XIV) que la mitad diaforásica del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella se protege contra el tratamiento térmico a

25°C por una variedad de nucleótidos piridínicos, flavínicos, púricos y pirimidínicos, excepción hecha del NADPH y NADP<sup>+</sup> los cuales son totalmente inefectivos. Ahora bien, cuando la temperatura del tratamiento es más alta, 45°C, el efecto protector se hace específico para el FAD (Figura 19), lo cual apoya el papel estructural y funcional del FAD como constituyente esencial de la nitrato reductasa de Chlorella fusca (5,7).

La azida, el cianato y el carbamilo-fosfato han sido descritos como inhibidores competitivos respecto al nitrato de la nitrato reductasa de algas y plantas superiores (15,21). Nosotros hemos puesto de manifiesto que en ningún caso protegen contra la inactivación térmica de la mitad diaforásica (Tabla XVI), lo que está de acuerdo con que el lugar de acción de estos inhibidores se localice en la mitad terminal del complejo.

Los resultados que hemos presentado indican que algunos nucleótidos no sólo protegen, sino que incluso activan la mitad diaforásica del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella contra la inactivación térmica a 25°C. De entre todos los nucleótidos ensayados hay dos que se

destacan por este efecto, el NADH y el FAD. El que estos dos nucleótidos sean los más eficaces podría estar relacionado con el hecho de que, por un lado el NADH es el donador fisiológico de electrones del enzima, y por otro, el FAD un componente esencial del complejo enzimático. Los restantes nucleótidos, probablemente debido a su analogía química con los anteriores, son también capaces de proteger contra la inactivación térmica de la diaforasa.

Por las razones anteriormente expuestas y por el hecho de que ni el nitrato ni los inhibidores competitivos respecto al mismo, que actúan sobre la segunda actividad del complejo, sean capaces de proteger contra la inactivación térmica de la primera actividad, hace pensar que el lugar de acción de los nucleótidos se localiza en la NADH-diaforasa.

En el caso concreto del NADH hemos encontrado que no sólo protege y estimula los niveles originales de diaforasa, sino que además puede reactivar una preparación diaforásica parcialmente inactivada por el calor (Figura 18). Es muy interesante el hecho de que el NADPH, a pesar de su parecido molecular con el NADH, sea incapaz

de proteger contra la inactivación térmica. El NADH ejerce su efecto protector al máximo aún en presencia de NADPH a concentración diez veces mayor. Estos hechos sugieren que el NADPH no puede ejercer su efecto protector sobre la diaforasa debido a que la afinidad del enzima por el nucleótido fosforilado es muy pequeña. A este respecto hay que señalar que la actividad diaforásica propia del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella es patente sólo frente al NADH y casi insignificante con NADPH (9).

A la vista de los resultados que hasta ahora hemos discutido podemos sugerir que el tratamiento térmico provoca un cambio de conformación de la mitad diaforásica que da lugar a su inactivación. Aparentemente, la unión de diversos nucleótidos a la proteína la hacen especialmente resistente contra dicho cambio de conformación.

Se ha demostrado en diferentes organismos (15;21, 105) que el p-MB inhibe la reducción de nitrato por la nitrato reductasa cuando utiliza NADH como donador de electrones. Estos resultados parecen sugerir la existencia de grupos sulfhidrilos, especialmente en la mitad diaforási-

ca del complejo, necesarios para la actividad enzimática. El NADH y el FAD son efectivos protectores contra la inactivación por p-MB de la nitrato reductasa de espinaca (21) mientras que, únicamente el NADH protege al enzima de Chlorella (15).

En el presente trabajo se muestra (Tabla XVII) que, entre una variedad de sustratos y coenzimas ensayados, únicamente el NADH y, en menor grado, el FAD (cf., 15) protegen a la diaforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella contra su inactivación por p-hidroximercuribenzoato. Puesto que el  $\text{NAD}^+$  no es capaz de ejercer efecto alguno, se puede sugerir que la protección por NADH se debe a una reducción, posiblemente al mantener reducidos los grupos -SH del sitio catalítico frente a su bloqueo por el p-HMB. A este respecto hay que señalar que el NADPH es totalmente inefectivo. El efecto protector del FAD se podría explicar suponiendo que dicho nucleótido se incorpora a la molécula de enzima -probablemente al sitio catalítico- haciendo menos accesibles los grupos sulfhidrilos a la acción del mercurial.

## **V. CONCLUSIONES**

- 1.- Tanto el NADH como el NADPH producen in vitro la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa de Chlorella fusca sin afectar a la actividad NADH-diaforasa. La inactivación es proporcional a la concentración de piridín-nucleótido.
- 2.- La nitrato reductasa inactivada por los piridín-nucleótidos reducidos puede reactivarse, también in vitro, por oxidación con ferricianuro potásico ó con 2,6-diclorofenol indofenol.
- 3.- La adición de amoníaco al medio de cultivo provoca la inactivación in vivo de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa sin afectar al nivel de diaforasa. La nitrato reductasa inactivada in vivo por el amoníaco se puede reactivar in vitro por acción del ferricianuro, lo que sugiere que el enzima inactivo se encuentra en su forma reducida.
- 4.- El arseniato y la metilamina, agentes desacopiantes -como el amoníaco- de la fotofosforilación no cíclica, provocan también la inactivación in vivo de la nitrato

- reductasa. El ferricianuro reactiva, igualmente, al enzima inactivo en estas condiciones.
- 5.- La menadiona (vitamina K<sub>3</sub>) -que fotooxida el poder reductor que se forma en la Fotosíntesis- impide la inactivación in vivo de la nitrato reductasa por amoníaco, arseniato ó metilamina.
  - 6.- Los agentes desacoplates citados no ejercen ningún efecto sobre la actividad de la nitrato reductasa en la oscuridad, lo cual parece indicar que su mecanismo de acción está estrechamente ligado a las reacciones luminosas de la Fotosíntesis.
  - 7.- La nitrato reductasa se puede también inactivar in vivo mediante tratamientos que -como la anaerobiosis- determinan que se acumule poder reductor dentro de la célula.
  - 8.- El ADP potencia de manera específica la inactivación in vivo de la nitrato reductasa por NADH.
  - 9.- La concentración óptima de ADP para la inactivación es equimolecular con la de NADH usada.

- 10.- La inactivación por NADH y ADP es de tipo reversible, recuperando al enzima sus niveles originales de actividad cuando se preincuba con ferricianuro.
- 11.- El nitrato y diferentes inhibidores competitivos de la nitrato reductasa, tales como azida, cianato y carbamill-fosfato, protegen al enzima contra su inactivación por NADH y ADP.
- 12.- Los resultados anteriores permiten concluir que el amoníaco, y demás agentes desacoplaentes, actúan in vivo sobre la nitrato reductasa de manera indirecta, al desacoplar la fotofosforilación no cíclica y determinar, como consecuencia, un acúmulo en la célula de poder reductor y ADP, coenzimas que directamente provocan la inactivación del enzima.
- 13.- El NADH y el  $\text{NAD}^+$ , así como los nucleótidos flavínicos y una serie de nucleótidos púricos y pirimídicos, protegen -e incluso activan- la diáforasa del complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella contra la inactivación térmica a  $25^{\circ}\text{C}$ . Tanto el  $\text{NADP}^+$  como el NADPH son

totalmente inefectivos.

- 14.- Cuando la temperatura de tratamiento es más alta (45°C), el efecto protector se hace específico para el FAD, lo que confirma que dicho coenzima es un componente esencial para la actividad del complejo.
- 15.- El grado de protección por NADH, NAD<sup>+</sup> y ADP contra la inactivación térmica de la NADH-diaforasa es dependiente de la concentración del nucleótido.
- 16.- El NADH no sólo protege y estimula la actividad original sino que incluso es capaz de reactivar una preparación de NADH-diaforasa parcialmente inactiva.
- 17.- El NADH y, en menor proporción, el FAD son los únicos compuestos entre los ensayados que protegen a la actividad diaforásica contra la inactivación por *p*-hidroximercuribenzoato, lo cual pone de manifiesto la importancia de ambos nucleótidos, uno como sustrato y el otro como grupo prostético, en el complejo enzimático NADH-nitrato reductasa de Chlorella.

## VI. BIBLIOGRAFIA

1. ARNON, D.I. Photosynthetic activity of isolated chloroplasts. Physiol. Rev., 47, 317-358 (1967).
2. LOSADA, M. La fotosíntesis del nitrógeno nítrico. Real Academia de Ciencias, Madrid 1972.
3. PANEQUE, A. y M. LOSADA. Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH and NADPH. Biochim. Biophys. Acta, 128, 202-204 (1966).
4. PANEQUE, A., P.J. APARICIO, L. CATALINA y M. LOSADA. Enzymatic reduction of nitrate with flavin nucleotides reduced by a new chloroplast NADH-specific diaphorase. Biochim. Biophys. Acta, 162, 149-151 (1968).
5. ZUMFT, W.G., A. PANEQUE, P.J. APARICIO y M. LOSADA. Structural and functional role of FAD in the NADH-nitrate reducing system from Chlorella. FEBS Letters, 9, 157-160 (1970).
6. LOSADA, M., P.J. APARICIO y A. PANEQUE. Separation of two enzyme activities in the reduction of nitrate with NADH. En Progress in Photosynthesis Research, vol. III, editado por H. Metzner, Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Tübingen (1969), pág. 1504-1509.

7. ZUMFT, W.G., A. PANEQUE, P.J. APARICIO y M. LOSADA. Mechanism of nitrate reduction in Chlorella. Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 980-986 (1969).
8. BAREA, J.L., J.M. MALDONADO y J. CARDENAS. Caracterización del sistema reductor de nitrato de Chlamydomonas reinhardtii. XIV Reunión de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Sevilla (1973), Resúmenes 3.4.
9. APARICIO, P.J. Mecanismo molecular de la reducción del nitrato a nitrito en plantas. Anales de la Universidad Hispalense, Serie Ciencias, núm. 13 (1971).
10. HAGEMAN, R.H. y D.P. HUCKLESBY. Nitrate reductase from higher plants. En Methods in Enzymology, vol. XXIII, editado por A. San Pietro, Academic Press, New York (1971), pág. 491-503.
11. GARRET, R.H. y A. NASON. Further purification and properties of Neurospora crassa nitrate reductase. J. Biol. Chem., 244, 2870-2882 (1969).

12. NASON, A., A.D. ANTONIE, P.A. KETCHUM, W.A. FRAZIER III y D.K. LEE. Formation of assimilatory nitrate reductase by In vitro Inter-cistronic complementation in Neurospora crassa. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 65, 137-144 (1970).
13. KETCHUM, P.A., H.Y. CAMBIER, W.A. FRAZIER III, C.H. MADANSKY y A. NASON. In vitro assembly of Neurospora assimilatory nitrate reductase from proteins subunits of Neurospora mutants and the xanthine oxidizing or aldehyde oxidase systems of higher animals. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 66, 1016-1023 (1970).
14. NASON, A., K.Y. LEE, S.S. PAN, P.A. KETCHUM, A. LAMBERTI y J. DeVRIES. In vitro formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a Neurospora mutant and a component of molybdenum-enzymes. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 68, 3242-3246 (1971).
15. VEGA, J.M., J. HERRERA, A.M. RELIMPIO y P.J. APARICIO. NADH-nitrate réductase de Chlorella: Nouvelle contribution a l'étude de ses propriétés. Physiol. Vég., 10, 637-652 (1972).

16. GONZALEZ-MORENO, C. Interconversión entre una forma oxidada y activa de la nitrato reductasa y otra reducida e inactiva. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1973).
17. RIGANO, C. Quelques observations préliminaires concernant la nitrato-réductase d'Ankistrodesmus braunii. Arch. Mikrobiol., 70, 147-156 (1970).
18. EVANS, H.J. y A. NASON. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. Plant Physiol., 28, 233-254 (1953).
19. HEWITT, E.J. y D.J.D. NICHOLAS. Enzymes of inorganic nitrogen metabolism. En Modern Methods of Plant Analysis, vol. 7, editado por H.F. Linsken, B.D. Sanwal y H.V. Tracey, Springer Verlag, Berlin (1964), pág. 67-172.
20. SCHRADER, L.E., G.L. RITENOUR, G.L. EILRICH y R.H. HABEMAN. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. Plant Physiol., 43, 930-940 (1968).
21. RELINPIO, A.M., P.J. APARICIO, A. PANEQUE y M. LOSADA. Specific protection against inhibitors of the NADH-nitrate reductase complex from spinach. FEBS Letters, 17, 226-230 (1971).

22. BAREA, J.L. El sistema reductor de nitrato de Chlamydomonas reinhardi. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1974).
23. BAREA, J.L., J.M. MALDONADO y J. CARDENAS. The nitrate reductase complex from Chlamydomonas reinhardi. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca (1973): Resúmenes d 102.
24. APARICIO, P.J., J. CARDENAS, W.G. ZUNFT, J.M. VEGA, J. HERRERA, A. PANEQUE y M. LOSADA. Molybdenum and Iron as constituents of the enzymes of the nitrate reducing system from Chlorella. Phytochem., 10, 1487-1495 (1971).
25. VEGA, J.M., J. HERRERA, P.J. APARICIO, A. PANEQUE y M. LOSADA. Role of molybdenum in nitrate reduction by Chlorella. Plant Physiol., 48, 294-299 (1971).
26. PANEQUE, A., J.M. VEGA, J. CARDENAS, J. HERRERA, P. J. APARICIO y M. LOSADA. <sup>185</sup>W-labelled nitrate reductase from Chlorella. Plant Cell Physiol., 13, 175-178 (1972).

27. GUERRERO, M.G. y J.M. VEGA. Molibdeno y hierro como constituyentes de los enzimas del sistema reductor de nitrato de Azotobacter chroococcum. XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Sevilla (1973), Resúmenes 3.3.
28. BARRET, R.H. y A. NASON. Involvement of a  $b_5$ -type cytochrome in the assimilatory nitrate reductase of Neurospora crassa. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 58, 1603-1610 (1967).
29. RIVAS, J., M<sup>a</sup> TORTOLERO y A. PANEQUE. Metal components of the nitrate-reducing system from the yeast Torulopsis nitratophila. Plant Sci. Letters, 2, 283-288 (1974).
30. HEIMER, Y.M., J.L. WRAY y P. FILNER. The effect of tungstate on nitrate assimilation in higher plants tissues. Plant Physiol., 44, 1197-1199 (1969).
31. WRAY, J.L. y P. FILNER. Structural and functional relationships of enzyme activities induced by nitrate in barley. Biochem. J., 119, 715-725 (1970).

32. NOTTON, B.A. y E.J. HEWITT. The role of tungsten in the inhibition of nitrate reductase activity in spinach (*Spinacea oleracea* L.) leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 702-710 (1971).
33. NOTTON, B.A. y E.J. HEWITT. Incorporation of radioactive molybdenum into proteins during nitrate reductase formation and effect of molybdenum on nitrate reductase and diaphorase activities in spinach (*Spinacea oleracea* L.). Plant Cell Physiol., 12, 465-477 (1971 a).
34. HOLZER, H. y W. DUNTZE. Metabolic regulation by chemical modification of enzymes. Ann. Rev. Biochem., 40, 345-374 (1971).
35. NASCHE, R.H., L. HEILMEYER y E. HELMREICH. Why are enzymes interconvertibles?. En Metabolic Interconversion of Enzymes editado por O. Wieland, E. Helmreich y H. Holzer, Springer Verlag, Berlin (1972), pág. 405-415.
36. HERRERA, J. Mecanismo de regulación de la síntesis y de la actividad de la nitrate reductasa de *Chlamydomonas reinhard* Tesis Doctoral, Universidad de Granada (1972).

37. BEEVERS, L. y R.H. HAGEMAN. Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 495-522 (1969).
38. SYRETT, P.J. y I. MORRIS. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in Chlorella. Biochim. Biophys. Acta, 67, 566-575 (1963).
39. MORRIS, I. y P.J. SYRETT. The development of nitrate reductase in Chlorella and its repression by ammonium. Arch. Mikrobiol., 47, 32-41 (1963).
40. LOSADA, M., A. PANEQUE, P.J. APARICIO, J.M. VEGA, J. CARDENAS y J. HERRERA. Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in Chlorella. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 1009-1015 (1970).
41. HERRERA, J., A. PANEQUE, J.M. MALDONADO, J.L. BAREA y M. LOSADA. Regulation by ammonia of nitrate reductase synthesis and activity in Chlamydomonas reinhardtii. Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 996-1003 (1972).
42. RIVAS, J. Caracterización del sistema reductor de nitrato de la estirpe M-14 del alga Chlorella fusca y de la levadura Torulopsis nitratophila. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1973).

43. LOSADA, M. The assimilatory nitrate reducing system, and its regulation by ammonia in Chlorella. 1<sup>st</sup> International Symposium on Metabolic Interconversion of Enzymes. S. Margherita, Italy (1970), Resúmenes pág. 59-64.
44. LOSADA, M., J. HERRERA, J.M. MALDONADO y A. PANEQUE. Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in Chlamydomonas. Plant Sci. Letters, 1, 31-37 (1973).
45. MORENO, C.B., P.J. APARICIO, E. PALACIAN y M. LOSADA. Interconversion of the active and inactive forms of Chlorella nitrate reductase. FEBS Letters, 26, 11-14 (1972).
46. MORENO, C.B., F. CASTILLO, F.F. DE LA ROSA y E. PALACIAN. Reversible inactivation of the nitrate reductases from Chlorella fusca and spinach. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca (1973), Resúmenes d 98.
47. MORENO, C.B. y E. PALACIAN. Nitrate reductase from Chlorella fusca. Reversible inactivation by thiols and sulfite. Arch. Biochem. Biophys., 160, 269-273 (1974).

48. RIGANO, C. Studies on nitrate reductase from Cyanidium caldarium. Arch. Mikrobiol., 76, 265-276 (1971).
49. RIGANO, C. y U. VIOLANTE. A latent nitrate reductase from a thermophilic alga. Biochem. Biophys. Res. Commun., 47, 372-379 (1972).
50. RIGANO, C. y U. VIOLANTE. Effect of nitrate, ammonia and nitrogen starvation on the regulation of nitrate reductase in Cyanidium caldarium. Arch. Mikrobiol., 90, 27-33 (1973).
51. RIGANO, C., G. ALLIOTA y U. VIOLANTE. Presence of high levels of nitrate reductase activity in Cyanidium caldarium grown on glutamate as the sole nitrogen source. Plant Sci. Letters, 2, 277-281 (1974).
52. VENNESLAND, B. y C. JETSCHMANN. The nitrate reductase of Chlorella pyrenoidosa. Biochim. Biophys. Acta, 229, 554-564 (1971).
53. SOLOMONSON, L.P. y B. VENNESLAND. Properties of a nitrate reductase of Chlorella. Biochim. Biophys. Acta, 267, 544-557 (1972).

54. JETSCHMANN, C., L.P. SOLOMONSON y B. VENNESLAND. Activation of nitrate reductase by oxidation. Biochim. Biophys. Acta, 275, 276-278 (1972).
55. SOLOMONSON, L.P., C. JETSCHMANN y B. VENNESLAND. Reversible inactivation of nitrate reductase of Chlorella vulgaris Beijerinck. Biochim. Biophys. Acta, 309, 32-43 (1973).
56. SOLOMONSON, L.P. Regulation of nitrate reductase activity by NADH and cyanide. Biochim. Biophys. Acta, 334, 297-308 (1974).
57. GUERRERO, M.G., J.M. VEGA, E. LEADBETTER y M. LOSADA. Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from Azotobacter chroococcum. Arch. Mikrobiol., 91, 287-304 (1973).
58. RIVAS, J., M.G. GUERRERO, A. PANEQUE y M. LOSADA. Characterization of the nitrate-reducing system of the yeast Torulopsis nitratophila. Plant Sci. Letters, 1, 105-113 (1973).
59. HERRERA, J. y D.J.D. NICHOLAS. Inactivation of nitrite oxidase and nitrate reductase by NADH in Nitrobacter agilis. Biochim. Biophys. Acta, (enviado para su publicación).

60. BASSHAM, J.A. The control of photosynthetic carbon metabolism. Science, 172, 526-534 (1971).
61. JENSEN, R.G. y J.A. BASSHAM. Photosynthesis by isolated chloroplasts. III Light activation of the carboxylation reaction. Biochim. Biophys. Acta, 153, 227-234 (1968).
62. FULLER, R.C. y G.A. HUDOCK. Triose phosphate deshydrogenase in plant and microbial photosynthesis. En Biochemistry of chloroplasts, editado por T.W. Goodwin, vol. II, Academic Press, New York (1967), pág. 181-190.
63. MULLER, B., I. ZIEGLER y H. ZIEGLER. Lichtinduzierte, reversible aktivitätssteigerung der NADP-abhängigen glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase in chloroplasten. Zum mechanism der reaction. Eur. J. Biochem., 9, 101-106 (1969).
64. SMILLIE, R.M. Can. J. Bot., 41, 123-134 (1964).
65. BUCHANAN, B.B., P. SCHURMANN y P.P. KALBERER. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. J. Biol. Chem., 246, 5952-5959 (1971).

66. JOHNSON, E.J. Occurrence of the adenosine monophosphate inhibition of carbon dioxide fixation in photosynthetic and chemosynthetic autotrophs. Arch. Biochem. Biophys., 114, 178-183 (1966).
67. MacELROY, R.D., E.J. JOHNSON y M.K. JOHNSON. Control of ATP-dependent CO<sub>2</sub> fixation in extracts of Hydrogenomonas facilis: NADH regulation of Phosphoribulokinase. Arch. Biochem. Biophys., 131, 272-275 (1969).
68. MALDONADO, J.M., J. HERRERA, A. PANEQUE y M. LOSADA. Reversible inactivation by NADH and ADP of Chlorella fusca nitrate reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 27-33 (1973).
69. MALDONADO, J.M., M<sup>te</sup> C. PUEYO y A. CHAPARRO. Propiedades reguladoras de la nitrato reductasa del alga Chlorella. Rev. Acad. Cienc. Madrid, (en prensa).
70. PANEQUE, A., J. HERRERA, J.M. MALDONADO y M. LOSADA. El complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella y la regulación de sus dos actividades. XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Sevilla (1973), Resúmenes 3.5.

71. MALDONADO, J.M., M<sup>a</sup> C. PUEYO y A. CHAPARRO. Propiedades reguladoras de la nitrato reductasa del alga Chlorella. XIII Reunión de la Sociedad Española de Bioquímica, Madrid (1974), Resúmenes pág. 120.
72. HERRERA, J., J.M. MALDONADO, A. PANEQUE y M. LOSADA. Metabolic interconversion of the active and inactive forms of nitrate reductase from green algae. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca (1973), Resúmenes p. 101.
73. MALDONADO, J.M., M<sup>a</sup> TORTOLERO, A. CHAPARRO, A. PANEQUE y M. LOSADA. Regulación in vivo, e in vitro de la nitrato reductasa del alga Chlorella. XXXI Congreso Luso-Español para el Progreso de las Ciencias, Cádiz (1974), Resúmenes pág. 120.
74. KESSLER, E. y F.C. CZYGAN. Physiologische und biochemische beitrage zur taxonomie der gattung Chlorella. Arch. Mikrobiol., 70, 211-216 (1970).
75. PANEQUE, A., F.F. DEL CAMPO, J.M. RAMIREZ y M. LOSADA. Flavine nucleotide nitrate reductase from spinach. Biochim. Biophys. Acta, 109, 79-85 (1965).

76. SNELL, E.D. y C.T. SNELL. Colorimetric methods of analysis. D. Van Nostrand Company, Academic Press, New York (1949), pág. 804.
77. PANEQUE, A., P.J. APARICIO y H. LOSADA. Enzymatic reduction of nitrate with NADH. Agrochim., 13, 177-184 (1968).
78. APARICIO, P.J., A. PANEQUE, H. RODRIGUEZ-LOPEZ y H. LOSADA. Estudio de la nitrato reductasa del alga Chlorella. Anál. Aula Del, 10, 744-753 (1969).
79. CONWAY, E.J. Microdiffusion analysis and volumetric error. Crosby Lockwood, London (1957), pgs. 90-132.
80. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
81. WARBURG, O. y W. CHRISTIAN. Isolierung und kristallisation des gärungsferments enolase. Biochem. Z., 310, 384 (1941).
82. GARRET, R.H. y P. GREENBAUM. The inhibition of the Neurospora crassa nitrate reductase complex by metal-binding agents. Biochim. Biophys. Acta, 302, 24-32 (1973).

83. LOSADA, M. y D.I. ARNON. Selective inhibitors of photosynthesis. En Metabolic Inhibitors, vol. II, editado por R.M. Hochster y J.H. Quastel, Academic Press, New York (1963), pág. 559-593.
84. GOOD, H.E. Activation of the Hill reaction by amines. Biochim. Biophys. Acta, 40, 502-517 (1960).
85. BASSHAM, J.A. Photosynthetic carbon metabolism. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 2877-2882 (1971).
86. HERRERA, J., J.M. MALDONADO, J.M. VEGA, A. PANEQUE y M. LOSADA. Metabolic interconversion of  $\text{FMN}_2$ -nitrate reductase in Chlamydomonas reinhardtii. VIII FEBS Meeting, Amsterdam (1972), Resúmenes 936.
87. WARBURG, O. Prefatory chapter. Ann. Rev. Biochem., 33, 1-14 (1964).
88. WARBURG, O., G. KRIPPAHL y C. JETSCHMANN. Widerlegung der photolyse des wassers und beweis der photolyse der kohlen-säure nach versuchen mit lebender Chlorella und den Hill-reagentien nitrat und  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . Z. Naturforsch., 20 B, 993-996 (1965).

89. LOSADA, N., J.M. RAMIREZ, A. PAÑEQUE y F.F. DEL CAMPO. Light and dark reduction of nitrate in a reconstituted chloroplast system. Biochim. Biophys. Acta, 109, 86-96 (1965).
90. PAÑEQUE, A., P.J. APARICIO, J. CÁRDENAS, J.M. VEGA y N. LOSADA. Nitrate as a Hill reagent in a reconstituted chloroplast system. FEBS Letters, 3, 57-59 (1969).
91. SHAW, W.V., L. TSAI y E.R. STADMAN. The enzymatic synthesis of N-methylglutamic acid. J. Biol. Chem., 241, 935-945 (1966).
92. BELLION, E. y L.B. HERSCH. Methylene metabolism in a Pseudomonas species. Arch. Biochem. Biophys., 153, 368-374 (1972).
93. KRAUSE, G.H. y J.A. BASSHAM. Induction of respiratory metabolism in illuminated Chlorella pyrenoidosa and isolated spinach chloroplasts by the addition of vitamin K<sub>5</sub>. Biochim. Biophys. Acta, 172, 553-565 (1969).

94. NELSON, N. y I. ILAN. Inhibition of nitrate reductase from tomato leaves by adenosine-5'-diphosphate. Plant Cell Physiol., 10, 143-148 (1969).
95. EAGLESHAM, A.R.J. y E.J. HEWITT. Kinetics and inhibition by adenosine phosphates and nitrite of nitrate reductase from Spinacea oleracea L. Biochem. J., 122, 18p-19p (1971).
96. EAGLESHAM, A.R.J. y E.J. HEWITT. The regulation of nitrate reductase activity from spinach (Spinacea oleracea L.) leaves by thiol compounds in the presence of adenosine-5'-diphosphate. FEBS Letters, 16, 315-318 (1971).
97. KANAZAWA, T., K. KANAZAWA, M.R. KIRK y J.A. BASSHAM. Regulatory effects of ammonia on carbon metabolism in Chlorella pyrenoidosa during photosynthesis and respiration. Biochim. Biophys. Acta, 256, 656-669 (1972).
98. MacELROY, R.D., H.M. MACK y E.J. JOHNSON. Properties of phosphoribulokinase from Thiobacillus neapolitanus. J. Bacteriol., 112, 532-538 (1972).

99. MULLER, B. On the mechanism of the light-induced activation of the NADP-dependent glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta, 205, 102-109 (1970).
100. McFADDEN, B.A. y E. SCHUSTER. 3-phosphoglycerate kinase from Hydrogenomonas facilis. J. Bacteriol., 109, 751-756 (1972).
101. PACOLD, I. y L.E. ANDERSON. Energy charge control of the Calvin cycle enzyme 3-phosphoglyceric acid kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 139-143 (1973).
102. SHAFER, J.Jr., J.E. BAKER y J.F. THOMPSON. A Chlorella mutant lacking nitrate reductase. Am. J. Bot., 48, 896-899 (1961).
103. BEEVERS, L., D. FLESHER y R.H. HAGEMAN. Studies on the pyridine nucleotide specificity of nitrate reductase in higher plants and its relationships to sulfhydryl level. Biochim. Biophys. Acta, 89, 453-464 (1964).
104. SANDERSON, G.W. y E.C. COCKING. Enzymic assimilation of nitrate in tomato plants. I Reduction of nitrate to nitrite. Plant Physiol., 39, 416-422 (1964).

105. DOWNEY, R.J. Characterization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase of Aspergillus nidulans. J. Bacteriol., 105, 759-768 (1971).
106. LOSADA, M. y A. PANEQUE. Mecanismo molecular de la asimilación fotosintética del nitrato en algas y plantas superiores. I.Q., núm. 16, 41-45 (1970).
107. KAPLAN, F., P. SETLOW y N.O. KAPLAN. Purification and properties of a DPNH-TPNH diaphorase from Clostridium Kluyverii. Arch. Biochem. Biophys., 132, 91-98 (1969).

FACULTAD DE CIENCIAS

Tribunal integrado por los abajo firmantes:

El día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Jose de Maldonado Ruiz

titulada Regulación de la actividad del Complejo  
NADH-NITRATO reductasa de Chlorella  
fusca!!

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE

CUM LAUDE

Sevilla, 23 de Septiembre 1.974

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,



El Presidente,

El Secretario,

El Doctorado,

