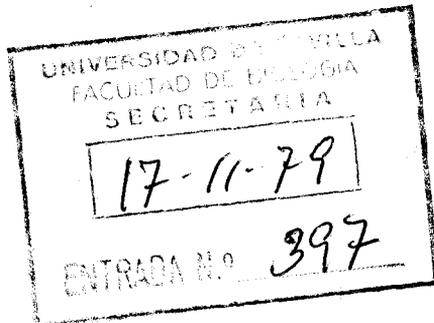


R. 4046



TD
674

TD
674

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA FERREDOXINA-NITRATO REDUCTASA
DE LA CIANOBACTERIA *Anacystis nidulans*

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias
por el Licenciado PEDRO CANDAU CHACON

Pedro Candau Chacón

Sevilla, Noviembre de 1979

DIRECTOR

Dr. Miguel García Guerrero
Colaborador Científico del CSIC

CODIRECTOR

Dr. Carlos Manzano Harriero

PONENTE

Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

A Isabel

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla que dirige el Profesor Manuel Losa da Villasante, a quien agradezco el haberme acogido en su equipo de investigación, así como su orientación, interés y estímulo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Miguel García Guerrero, Director de esta Tesis, agradezco su dedicación e interés, al igual que su valiosa aportación de ideas y ayuda tanto científica como humana.

Al Dr. Carlos Manzano Harriero, Codirector de esta Tesis, agradezco profundamente su amistad, enseñanza y dedicación a lo largo de estos años, así como la eficaz participación que ha tenido en todo momento en la obtención de los resultados que aquí se presentan.

A los demás miembros de este Departamento, con los que he convivido durante estos años, agradezco su ayuda, en especial a aquellos con los que he colaborado más estrechamente. A Pepa Pérez de León y José Moreno agradezco, igualmente, su valiosa ayuda en la realización de esta Tesis.

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

A	absorbancia
ADH	alcohol deshidrogenasa
BSA	seroalbúmina bovina
BV	bencilviológeno
cat	catalasa
cit <i>c</i>	citocromo <i>c</i>
D	dalton
DEAE	dietilaminoetil
DPIP	2,6-diclorofenol-indofenol
DTE	ditioeritritol
$E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}}$	coeficiente de extinción mg/ml para un paso de luz de 1 cm
$E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}}$	coeficiente de extinción milimolar para un paso de luz de 1 cm
E'_0	potencial standard de óxido-reducción.
EDTA	ácido etilendiamintetraacético
EDTA·Na ₂	etilendiamintetraacetato disódico
F <i>α</i>	fosforilasa <i>α</i>
FAD	flavin adenín dinucleótido
Fd	ferredoxina
FMN	flavín mononucleótido
<i>g</i>	aceleración de la gravedad
h	hora
INT	yodonitrotetrazolio cloruro
K _i	constante de inhibición
K _m	constante de Michaelis
min	minuto

MV	metilviológeno
NADP	NADP ⁺ ó NADPH indistintamente
NAD(P) ⁺	nicotinamida adenfn dinucleótido (fosfato)
NAD(P)H	nicotinamida adenfn dinucleótido (fosfato) reducido
NADPRasa	NADP reductasa
NNEDA	N-{Naftil-(1)}-etilendiamina diclorhidrato
NO ₃ Rasa	nitrato reductasa
OV	ovoalbúmina
PM	peso molecular
p/v	peso/volumen
QT	quimotripsinógeno
r ²	coeficiente de correlación
r.p.m.	revoluciones por minuto
S	unidad Svedberg (10 ⁻¹³ s)
s _{20,w}	coeficiente de sedimentación
SDS	dodecilsulfato sódico
Sulfo-DSPD	N,N'-disaliciliden-1,3-diaminopropano disulfonato
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamina
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
U	unidad de actividad enzimática
v/v	volumen/volumen
v.c.e.	volumen de células empaquetadas
V _e	volumen de elución
V _{max}	velocidad máxima
V _o	volumen vacío
vol	volumen
V _t	volumen total
\bar{x}	media

I. INTRODUCCION

El nitrógeno es uno de los elementos cualitativa y cuantitativamente más importantes de la materia viva, en la que se encuentra como componente de algunas de las biomoléculas más representativas, tales como proteínas y ácidos nucleicos. La vía de entrada del nitrógeno en los seres vivos es el Reino Vegetal, a través del cual llega a los animales en el estado de máxima reducción correspondiente al nitrógeno orgánico. También las plantas necesitan que el nitrógeno esté reducido al máximo para poder combinarlo con compuestos carbonados y formar así los distintos compuestos nitrogenados de sus células. Sin embargo, a diferencia de los animales, las plantas tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno inorgánico existente en la Naturaleza, el cual reducen hasta amonio previamente a su incorporación.

Con excepción de un pequeño grupo de organismos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, la forma nitrogenada más utilizada es el nitrato, de lo que da idea el hecho de que se reduzcan anualmente unos 10.000 millones de toneladas de este compuesto (Beevers y Hageman, 1969; Losada, 1972).

La utilización de nitrato como fuente nitrogenada no está restringida a ningún grupo de organismos, sino que es general, siendo realizada tanto por algas y plantas superiores, como por distintos géneros de hongos y bacterias.

La diferencia existente entre los estados de reducción que presenta el nitrógeno en el nitrato, + 5, y en el amonio, -3, implica la necesidad de una transferencia de 8

electrones que, como ha quedado firmemente establecido, ocurre en sólo dos etapas: a) reducción de nitrato a nitrito, catalizada por el enzima nitrato reductasa, y b) reducción de nitrito a amonio, mediada por la nitrito reductasa, en reacciones que implican 2 y 6 electrones respectivamente (Beevers y Hageman, 1969, 1972; Hewitt, 1975; Hewitt *et al.*, 1976; Losada, 1976; Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979).

La reducción de nitrato a nitrito está catalizada por una molibdo proteína, la nitrato reductasa, que ha sido estudiada exhaustivamente en los últimos años. El enzima de organismos eucarióticos se ha clasificado como NAD(P)H-nitrato reductasa, atendiendo a la naturaleza de su donador fisiológico de electrones, los piridín nucleótidos reducidos. La nitrato reductasa de eucariotas fotosintéticos muestra una preferencia por NADH como donador de electrones, habiendo sido purificado a homogeneidad recientemente en el alga verde *Chlorella vulgaris*. En la NADH-nitrato reductasa de este alga se ha determinado la existencia de tres subunidades de 95-100 KD como constituyentes de un enzima de 356 KD de peso molecular, que contiene como grupos prostéticos 2 moléculas de FAD, dos grupos hemo del tipo *b*, y 2 átomos de molibdeno (Solomonson *et al.*, 1975). La situación en hongos, es similar, a excepción de la preferencia del enzima por NADPH, encontrándose también FAD, hemo *b*, y molibdeno en la molécula, si bien son solo dos las subunidades presentes (115 KD cada una) siendo, consecuentemente, su peso molecular (230 KD) inferior al de eucariotas fotosintéticos (Ga-

rett y Nason, 1969; Pan y Nason, 1979).

En eucariotas, la transferencia de los electrones al nitrato está mediada por dos actividades enzimáticas que operan secuencialmente y que, aunque no se han logrado separar físicamente, pueden ser ensayadas independientemente y se afectan de forma específica por distintos inhibidores y tratamientos. La primera de estas actividades es una NAD(P)H-diaforasa, que contiene FAD y que por ser la captadora de electrones es la que marca la especificidad por NADH ó NADPH en cada caso. La segunda actividad del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa es la nitrato reductasa terminal, también denominada FNH₂-nitrato reductasa, por su capacidad de utilizar flavín-nucleótidos (o viológenos) reducidos, como donadores de electrones. Estudios fisicoquímicos y enzimáticos de diversa índole han determinado que el molibdeno está implicado en esta segunda actividad, pensándose que este metal interacciona directamente con el nitrato. El papel de los grupos hemo, así como su participación en una u otra actividad, permanece aún sin aclarar definitivamente (Losa-da y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979).

A diferencia de lo que ocurre con la nitrato reductasa de eucariotas, que se considera soluble, en organismos procarióticos el enzima se encuentra, en general, unido a membranas de tipo fotosintético o respiratorio. En estos organismos parece no existir una actividad diaforásica similar a la del enzima de eucariotas, encontrándose que los piridín nucleótidos reducidos no se comportan como donadores de electrones adecuados para estos enzimas, si bien se han descrito

casos en los que se observaba reducción de nitrato con NADH en preparaciones de membranas de bacterias fotosintéticas y cianobacterias (Hattori y Myers, 1967; Hattori, 1970; Katoh, 1963).

La ferredoxina, una proteína sulfoférica de potencial muy negativo, es el principal candidato para desempeñar el papel de donador de electrones fisiológico de la nitrato reductasa de procariotas, habiendo sido descrita su participación en la reducción de nitrato en algunos organismos tanto fotoergónicos como quimioergónicos. En procariotas fotosintéticos, cianobacterias y bacterias fotosintéticas, la ferredoxina reducida por el fotosistema I podría ser el donador fisiológico de electrones para el enzima, si bien en bacterias no fotosintéticas la baja actividad de reducción observada con ferredoxina y la necesidad de utilizar sistemas exógenos para reducirla, dejan abierto a discusión su posible papel como donador fisiológico (Losada y Guerrero, 1979).

En la actualidad, la única nitrato reductasa de procariotas que se ha conseguido purificar hasta un nivel aceptable (95% de pureza) ha sido la de la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas capsulata*, encontrándose, tras una purificación de solo 60 veces, que la proteína, de peso molecular 185 KD, tiene dos subunidades iguales de 85 KD cada una, no presenta FAD y sí un átomo de molibdeno y 1 ó 2 grupos de hemo *c* por molécula (Alef y Klemme, 1977, 1979). El enzima no acepta electrones de los piridín nucleótidos reducidos, siendo su donador fisiológico desconocido por el momento. La baja actividad específica (menos de 1 U/mg proteína), así como el he-

cho de que preparaciones menos purificadas tuviesen actividades específicas superiores, es explicado por estos autores como la consecuencia de una destrucción parcial del enzima durante la purificación (Alef y Klemme, 1979). Esto significa que aún cuando el enzima esté purificado, el conocimiento que de él se tiene es escaso y además basado en un enzima de cuya integridad se duda.

El segundo enzima de la ruta de reducción de nitrato, la nitrito reductasa, ha sido identificado en eucariotas fotosintéticos como una ferroproteína de 63 KD de peso molecular que carece de FAD y contiene un grupo sirohemo y un centro sulfoférico del tipo $\{Fe_4-S_4^*\}$ (Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979; Cárdenas *et al.*, 1979; Lancaster *et al.*, 1979). A diferencia de la nitrito reductasa de hongos, que contiene FAD que acepta electrones de los piridín nucleótidos reducidos, la nitrito reductasa de algas verdes y plantas superiores, utiliza la ferredoxina reducida fotosintéticamente como donador de electrones (Losada y Guerrero, 1979; Vennesland y Guerrero, 1979; Cárdenas *et al.*, 1979), al igual que se ha encontrado para la nitrito reductasa de cianobacterias (Manzano *et al.*, 1976; Manzano, 1977; Méndez, 1979).

Las cianobacterias (alga verde-azuladas) constituyen un grupo perfectamente delimitado de microorganismos cuya presencia sobre la Tierra data de al menos 2.800 millones de años (Schopf, 1970). La singularidad de este grupo reside en unir a una estructura celular procariótica, un aparato fotosintético capaz de utilizar el agua como donador de electro-

nes, lo que le confiere una situación de puente entre las bacterias y las plantas superiores, de indudable interés evolutivo, y biológico en general (Fogg *et al.*, 1973; Stanier y Cohen-Bazire, 1977).

De igual forma que otros organismos fototrofos, las cianobacterias asimilan compuestos de nitrógeno inorgánico tales como nitrato, nitrito o amonio (Allen y Arnon, 1955), presentando algunas de ellas la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Fogg *et al.*, 1973). La importancia cuantitativa de la asimilación del nitrógeno inorgánico por estos organismos puede resaltarse señalando que el nitrógeno constituye del 4 al 9% del peso seco de las células.

En contraposición con el sistema reductor de nitrato de plantas superiores, algas y hongos, la información existente sobre el proceso de reducción de nitrato en cianobacterias es bastante escasa, aunque se ha demostrado que la reducción transcurre vía nitrito en dos reacciones enzimáticas consecutivas (Hattori, 1962; Manzano *et al.*, 1976; Manzano, 1977).

La nitrato reductasa de estos organismos se encuentra unida a membranas, pudiendo ser solubilizada por diversos procedimientos obteniéndose un enzima que es activo con donadores artificiales pero que no puede aceptar electrones de los piridín nucleótidos (Hattori y Myers, 1966, 1967; Hattori, 1970; Hattori y Uesugi, 1968a; Manzano *et al.*, 1976).

Preparaciones particuladas de *Anabaena cylindrica* ca-

talizan la reducción de nitrato con ferredoxina como donador cuando se preparan empleando ultrasonidos, mientras que si se utiliza acetona para ello es el NADH y no la ferredoxina el donador de electrones efectivo encontrado (Hattori y Myers, 1967). Cuando el enzima se solubiliza, solo los flavín nucleótidos, o los viológenos, reducidos sirven como donadores de electrones (Hattori, 1970). Sistemas reconstruidos de *Anabaena cylindrica*, empleando el sistema ascorbato/DPIP como donador de electrones del fotosistema I, llevan a cabo la reducción de nitrato y nitrito dependiente de ferredoxina (Hattori y Uesugi, 1968b).

En *Anacystis nidulans* y *Nostoc muscorum* se ha descrito la reducción fotosintética de nitrato por preparaciones de membranas que llevaban asociadas la actividad nitrato reductasa (Manzano *et al.*, 1976; Ortega *et al.*, 1976).

La ferredoxina parece ser el transportador de electrones entre el fotosistema I y el enzima, si bien en su ausencia aún tenía lugar una apreciable reducción de nitrato.

Utilizando enzima soluble de *A. nidulans* ligeramente purificado se ha comprobado que la ferredoxina reducida por el sistema NADPH/NADP reductasa de espinacas, era capaz de donar electrones a la nitrato reductasa (Manzano *et al.*, 1976; Manzano, 1977).

La reducción de nitrato en cianobacterias es un proceso íntimamente ligado a la fotosíntesis, habiéndose conseguido acoplar en preparaciones de membranas de *A. nidulans*, el

poder reductor generado a partir del agua por el aparato fotosintético a la reducción de nitrato a amonio, con desprendimiento estequiométrico de oxígeno (Candau *et al.*, 1976).

En el presente trabajo se presentan evidencias aclaratorias de algunos puntos conflictivos sobre la reducción de nitrato en cianobacterias y se aportan otras nuevas relativas a la participación de la ferredoxina como donador inmediato de electrones para la nitrato reductasa de *A. nidulans*.

Se ha desarrollado un procedimiento general de purificación de enzimas dependientes de ferredoxina, por cromatografía de afinidad redox en geles de ferredoxina-Sefarosa, que se ha aplicado con éxito a la purificación hasta homogeneidad de NADP reductasa y nitrato reductasa de *A. nidulans*, habiéndose estudiado en especial algunas de las propiedades de este último enzima.

Parte de este trabajo ha sido ya publicado (Manzano *et al.*, 1978), habiendo sido también objeto de comunicaciones a Congresos (Manzano *et al.*, 1977; Candau *et al.*, 1977; Manzano *et al.*, 1978; Candau *et al.*, 1979a,b,c).

II. MATERIALES Y METODOS

II.A. CULTIVO Y RECOGIDA DE CELULAS

II.A.1. Material biológico

El microorganismos utilizado en el presente trabajo ha sido la cianobacteria (alga verde-azulada) *Anacystis nidulans* L 1402-1 procedente de la colección de cultivos de la Universidad de Göttingen.

II.A.2. Condiciones standard de cultivo

Las células se cultivaron autotróficamente y en condiciones de esterilidad, utilizando frascos de Roux (de 1 y 4 l de capacidad) llenos hasta sus tres cuartas partes con un medio sintético modificado a partir del descrito por Allen y Arnon (1955). Un litro de dicho medio contenía en mmoles: NO_3K , 20; SO_4Mg , 0,5; Cl_2Ca , 0,1; ClNa , 2; MoO_4Na_2 , 0,004; PO_4HK_2 , 12; junto con 1 ml de solución de Fe-EDTA y 1 ml de solución de micronutrientes.

La solución de Fe-EDTA se preparó según Arnon *et al.* (1974). Para ello se disolvían 16 g de EDTA (ácido libre) y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua y se mezclaban con una disolución que contenía 13,7 g de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 364 ml de agua. A través de la mezcla se borboteaba aire durante varias horas, a fin de oxidar completamente el hierro. La solución final tenía un pH aproximado de 3, y contenía 5 mg de hierro y 13 mg de potasio por ml.

La solución de micronutrientes utilizada era una modificación de la solución de metales A₅ (Allen, 1978) y contenía en gramos por litro: BO_3H_3 , 2,86; $\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,81; $\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,252; $\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,222; $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,079.

El medio, conteniendo todos sus componentes a excepción del fosfato, se colocaba en los correspondientes frascos de cultivo, los cuales se tapaban con algodón graso. Atravesando el tapón se encontraba una varilla de vidrio hueca cuyo extremo inferior alcanzaba el fondo del tubo y cuyo extremo superior, relleno con una pequeña pieza de algodón hidrófobo, se prolongaba mediante un tubo de goma que serviría de conexión con el sistema de gaseo durante el cultivo de las células, y que se cerraba con una pinza antes de proceder a la esterilización del sistema. La esterilización se conseguía calentando en autoclave SELECTA (España) modelo P, durante 20 min a la presión de 1 atm (121°C). El fosfato se esterilizaba separadamente para evitar su precipitación y se añadía, una vez frío, en condiciones estériles.

El crecimiento se llevó a cabo en un cultivador de algas KNEISE (R.F.A.), que suministraba al cultivo una iluminación continua de 23 a 25 W/m^2 y mantenía su temperatura a 40°C (óptimo de crecimiento).

A través del medio de cultivo se burbujeaba una mezcla de aire- CO_2 en la proporción 98:2 (v/v) a fin de garantizar la agitación y el suministro de aire y CO_2 al cultivo.

Para la preparación del inóculo se partió de células cultivadas en medio sólido, de igual composición que el medio líquido pero suplementado con agar al 1,5% (p/v), o bien de las procedentes de anteriores cultivos en medio líquido. Estas células se cultivaban en frascos de fermentación de 200 ml de capacidad, conteniendo 150 ml de medio de cultivo, en las mismas condiciones descritas anteriormente.

II.A.3. Modificaciones de las condiciones standard de cultivo

Para la obtención de células deficientes en molibdeno, necesarias para los experimentos de competencia W-Mo, se utilizaba medio de cultivo sin molibdato, y con ClNH_4 (10 mM) en lugar de NO_3K como fuente de nitrógeno. La inoculación de estos cultivos se hizo originariamente con células provenientes de un cultivo standard, y posteriormente con células cultivadas en estas condiciones. Para minimizar la cantidad de molibdeno transferido al inocular por primera vez, así como para eliminar el medio antiguo, las células utilizadas como inóculo se sedimentaban previamente por centrifugación y se lavaban con medio fresco, todo ello en condiciones estériles.

Para obtener células deficientes en hierro necesarias para la obtención de la flavodoxina, se utilizaba medio standard al que no se añadía la solución de Fe-EDTA.

Los cultivos en gran escala, necesarios para obtener el material de partida para las purificaciones, se llevaron a cabo utilizando botellones de vidrio de 20 l de capacidad

(28 cm de diámetro), o bien recipientes de plástico polimetacrilato de 60 cm de longitud, 40 cm de altura y 20 cm de profundidad, de 40 l de capacidad útil. En estos casos se omitían las condiciones de esterilidad, la temperatura se mantenía entre 34 y 38°C, y la iluminación se llevaba a cabo por medio de paneles opuestos de tubos fluorescentes que suministraban una intensidad en la superficie de los tubos de 16 a 18 W/m². Los correspondientes recipientes se inoculaban con 5-7,5 vol de suspensión de células de tres días de crecimiento cultivadas en esterilidad, por cada 100 vol de medio.

En estas condiciones, y dada la ausencia de compuestos orgánicos en el medio de cultivo, no se presentaban problemas de contaminación durante el periodo de crecimiento (3-4 días).

II.A.4. Recogida de células

Cuando el volumen de células a recoger era menor de 3 l, la recogida se efectuaba por centrifugación a 3.000 x *g* durante 10 min. En caso de cantidades superiores, se utilizaba un sistema de centrifugación en flujo continuo Szent-Gyorgyi-Blum (SORVALL, U.S.A.) operado a 23.000 x *g* y 0,7 l/min de caudal, o bien una centrífuga SHARPLES (Francia) de flujo continuo a 39.200 x *g* y un caudal de 1,5 l/min.

En las condiciones descritas, el rendimiento de los cultivos standard era de 2-3 g de peso fresco por l de medio en tres días de crecimiento, bajando en los cultivos en gran

escala a la mitad aproximadamente, lo que parece deberse fundamentalmente a limitaciones en la iluminación.

II.B. PREPARACIONES Y ENSAYOS

II.B.1. Preparación de extractos celulares

Aproximadamente 90 g (peso fresco) de células provenientes de 80 l de cultivo, crecidas y recogidas como se ha indicado anteriormente, se resuspendieron en tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25 mM, EDTA 0,5 mM, preenfriado a 2°C, hasta un volumen final de 200 ml. La suspensión celular se sometía a tratamiento con ultrasonidos durante 15 periodos de 1 min alternados con otros tantos de igual duración en los que se interrumpía el tratamiento, a fin de mantener la temperatura por debajo de los 4°C. Durante toda la operación el recipiente que contenía las células se mantenía sumergido en un baño de agua a 0°C. La frecuencia de la oscilación era de 20 KHz y su potencia de 90 W (sonicador BRANSON, Inglaterra, mod. B 12).

A la suspensión de células así tratada, se le añadía ribonucleasa y desoxirribonucleasa (25 mg de cada una) para digerir los ácidos nucleicos y disminuir así la viscosidad de la preparación. Después de 100 min de incubación en frío, se transferían a un bote de centrifuga tras lavar el recipiente con 20 ml de T25, y se eliminaban los restos celulares por centrifugación a 3.300 x *g* durante 15 min. El sobrenadante de esta centrifugación (aproximadamente 195 ml) cons-

tituía el extracto crudo libre de células del que se partía en las purificaciones en gran escala. Este extracto mantenía aproximadamente el 85% de la actividad original.

II.B.2. Polvos de etanol

Los extractos utilizados en los experimentos de adsorción de nitrato reductasa y NADP reductasa a geles de ferredoxina-Sefarosa se obtuvieron de la siguiente forma: Una suspensión de aproximadamente 5 g (peso fresco) de células en 10 ml de tampón T25 se colocaba en un recipiente y se le añadía 200 ml de etanol absoluto preenfriado a -15°C . La suspensión se agitaba con una varilla a fin de eliminar los grumos de células y se dejaba sedimentar durante 30 min. Tras eliminar el sobrenadante por decantación, las células se lavaban con etanol frío (1-2 l) en un embudo Buchner hasta que el filtrado aparecía casi incoloro. Los restos de etanol se eliminaban lavando con 100-200 ml de dietileter a -15°C . El material retenido en el embudo se pulverizaba sobre un papel de filtro y se extendía para facilitar la evaporación del éter.

Los polvos obtenidos, de color azul, se extraían durante la noche (12 h) con 10 ml de tampón Tris-ClH, pH 7,5, 50 mM, conteniendo 0,1 M de NO_3K y 0,1 mM de EDTA. La preparación se centrifugaba a $40.000 \times g$ durante 20 min y, tras filtrar el sobrenadante por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con tampón Tris-ClH, pH 8,0, 10 mM, se utilizaba como extracto enzimático.

II.B.3. Obtención de preparaciones de membranas de *A.nidulans* con actividad de fotosistema I (nitrato reductasa particulada)

Se siguió un procedimiento similar al descrito por Manzano *et al.* (1976), con ligeras modificaciones. Las células de cultivo en fase exponencial de crecimiento se recogieron por centrifugación a 4.500 x *g* durante 10 min y, una vez lavadas con tampón fosfato potásico, pH 7,0, 50 mM, se resuspendieron en el mismo tampón (10 ml/g peso fresco de células) pero suplementado con sacarosa y EDTA·Na₂ a concentraciones 0,5 M y 10 mM, respectivamente. Se añadieron a la suspensión 100 mg de lisozima por g de células y se incubó a 35°C durante 2 h. Los esferoplastos resultantes se recogieron centrifugando a 4.500 x *g* durante 10 min, y se resuspendieron en el mismo volumen de tampón de lavado frío, suplementado esta vez con Cl₂Mg a una concentración de 10 mM. Tras 80 min de choque hipotónico en frío, se sometió la preparación a tratamiento con ultrasonidos durante dos periodos de 30 s (75 W a 20 KHz). Los restos celulares se eliminaron centrifugando 10 min a 4.500 x *g*, recogiendo posteriormente las partículas presentes en el sobrenadante, por centrifugación a 46.000 x *g* durante 30 min. Finalmente, las partículas sedimentadas se resuspendieron cuidadosamente en el volumen adecuado de tampón Tris-ClH, pH 7,5, 50 mM, para obtener una concentración final de partículas que contuviesen de 0,1 a 0,2 mg clorofila/ml.

II.B.4. Purificación de ferredoxina

La ferredoxina de *A. nidulans* se purificó siguiendo básicamente el procedimiento descrito por Smillie y Entsch (1971), que comprendía: obtención de polvos de acetona; extracción con tampón Tris-ClH, pH 7,8, 50 mM; fraccionamiento con sulfato amónico (60-100%); y cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa. Las modificaciones introducidas consistieron en la utilización de tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25 mM, en lugar del descrito, y en la sustitución de la columna de DEAE-celulosa por otra (18 mm x 5 cm) empaquetada con DEAE-Sephadex A-25 y equilibrada con el tampón anterior.

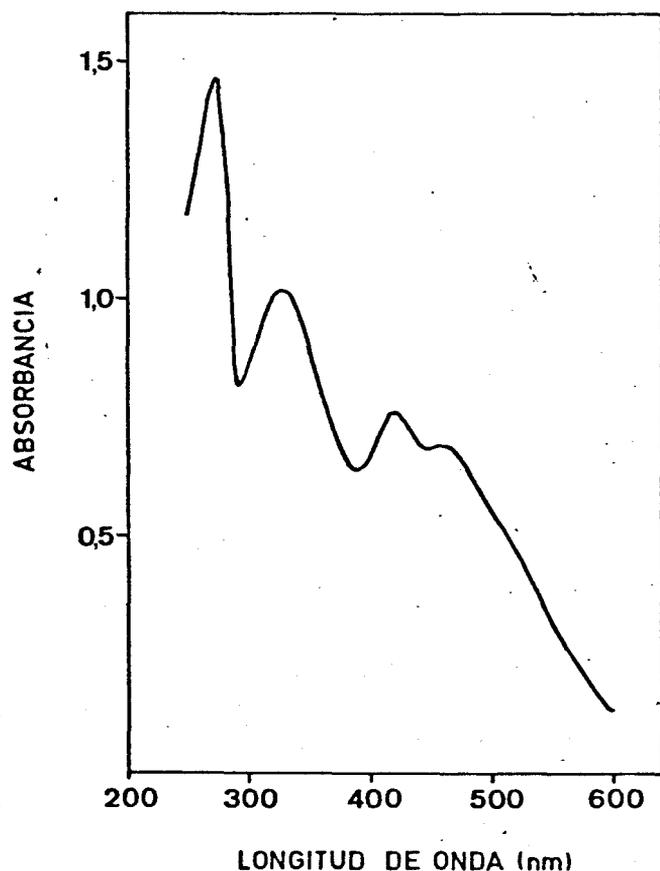


FIGURA 1. *Espectro de absorción de la ferredoxina de A. nidulans.* La proteína se encontraba a una concentración 0,12 mM en un tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25 mM

Los extractos enzimáticos utilizados en la purificación en gran escala de nitrato reductasa contenían una elevada cantidad de ferredoxina, la cual quedaba retenida en la

columna de DE-52 empleada en el paso de cromatografía de intercambio iónico. Una vez eluida la nitrato reductasa, la ferredoxina se recuperaba como se indica en el apartado III.D.1. La proteína así obtenida presentaba un alto grado de pureza a juzgar por su espectro de absorción (Fig. 1), considerablemente similar al descrito para esta ferredoxina por Yamanaka *et al.* (1969), si bien nuestra preparación presentaba una razón de valores de absorbancia A_{330} / A_{276} de 0,70, superior a la descrita por estos autores (0,68) para su ferredoxina, que describían como "casi homogénea según criterio de ultracentrifugación".

La ferredoxina de *Spirulina maxima* se purificó a partir de células secas del alga, según el método desarrollado por Hall *et al.* (1972), seguido de cromatografía en hidroxapatito Bio-Gel HTP, necesaria para eliminar los restos de ácidos nucleicos.

Las ferredoxinas obtenidas de las diferentes fuentes por los procedimientos indicados, se dializaban extensivamente antes de su uso, contra tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25mM, presentando siempre una relación de valores de absorbancia A_{423} / A_{276} igual o superior a 0,50.

II.B.5. Purificación de flavodoxina

La flavodoxina se preparó a partir de células de *A. nidulans* crecidas en medio de cultivo standard al que no se

La Sefarosa-4B activada con bromuro de cianógeno, se colocaba en un embudo de placa porosa y se dejaba hinchar durante 5-10 min en ClH 1 mM, manteniendo cerrada la salida del embudo. A continuación, se lavaba durante 15-20 min utilizando 200 ml de ClH 1 mM por cada g de gel seco.

El pH de la solución de ferredoxina se ajustaba a 10,5, por adición de tampón $\text{CO}_3^{=}/\text{CO}_3\text{H}^-$ hasta una concentración final de 0,1 M, y se mezclaba con la Sefarosa, ya tratada, en una proporción de unos 10 mg de ferredoxina por ml de gel, quedando finalmente la mezcla a un pH de 10,2. La mezcla se mantenía a 4°C y con agitación suave durante 12-16 h, terminadas las cuales la ferredoxina no unida se eliminaba por filtración seguida de lavado con 20 ml/g gel seco, de tampón fosfato potásico, pH 7,5, 5 mM, suplementado con $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$, 0,3 mM. Los grupos de la Sefarosa activada que no hubiesen reaccionado con la ferredoxina se bloqueaban incubando durante una hora con Tris-ClH, pH 7,5, 0,1 M, en una proporción de 20 ml de tampón por cada g de gel seco.

A partir de la absorbancia a 423 nm que presentaban los tampones de lavado se podía calcular que, en estas condiciones, un 75-80% de la ferredoxina quedaba unida covalentemente a la matriz, obteniéndose un gel de color marrón-rojizo que contenía unos 8 mg de ferredoxina por ml de gel.

Antes de utilizarse por primera vez, así como después de cada purificación, el gel de ferredoxina-Sefarosa se lavaba con ClNa 1,5 M en Tris-ClH, pH 8,5, 25 mM, a fin de

añadía hierro. El procedimiento empleado, tomado de Smillie y Entsch (1971), es el descrito en el apartado II.B.4. para la purificación de la ferredoxina. La pureza de la preparación se controló espectrofotométricamente.

II.B.6. Purificación de la NADP reductasa

La ferredoxina-NADP reductasa de hojas de espinacas se preparó siguiendo un procedimiento análogo al descrito por Shin *et al.* (1963), que incluía fraccionamientos con acetona y sulfato amónico, así como adsorciones a DEAE-celulosa. La preparación parcialmente purificada resultante, de color amarillo, presentaba una actividad de 34,2 U/ml en las condiciones de ensayo del apartado II.B.9.

El enzima de *A. nidulans* se purificó por doble cromatografía de afinidad como se indica en Resultados.

II.B.7. Preparación del gel de ferredoxina-Sefarosa

Antes de iniciarse el proceso de acoplamiento a la Sefarosa, la ferredoxina, tanto de *A. nidulans* como de *S. maxima*, se concentraba mediante adsorción a una columna de DEAE-Sephadex A-25 (18 mm x 1-2 cm), seguida de elución con tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25 mM, suplementado con ClNa a una concentración 0,8 M. El cloruro sódico y el tampón Tris-ClH se eliminaban por filtración a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con tampón fosfato potásico, pH 7,5, 5 mM.

eliminar cualquier posible protefna unida inespecificamente al mismo.

Mantenido a 2-4°C, el gel era estable indefinidamente, si bien se observaba una ligera decoloración y una pequeña pérdida de capacidad de unión de enzimas tras varios meses de uso.

II.B.8. Ensayo de la actividad nitrato reductasa

II.B.8.1. *Ensayo standard de la actividad nitrato reductasa*

Se llevó a cabo en tubos de 10 ml abiertos al aire, utilizando ditionito sódico como donador de electrones y metilviológeno como transportador.

La mezcla de reacción incluía en un volumen final de 1 ml: tampón $\text{CO}_3^{=}/\text{CO}_3\text{H}^-$, pH 10,5, 100 μmoles ; NO_3K , 20 μmoles ; metilviológeno, 4 μmoles ; $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ (85% de pureza), 2 mg disueltos en 0,1 ml de una solución 0,3 M de CO_3HNa (9,8 μmoles y 30 μmoles , respectivamente), y una cantidad adecuada de enzima.

La disolución de ditionito sódico (usualmente 2 ml de volumen final) se preparaba inmediatamente antes de usarse.

El ensayo se iniciaba con la adición del ditionito, se desarrollaba durante 5 min a 30°C, y se detenía provocando la oxidación rápida del ditionito mediante agitación vigorosa en un vibrador Super-mixer LAB LINE INSTRUMENTS (U.S.A.)

hasta la decoloración del color azul del metilviológeno reducido.

El nitrito formado en la reacción se determinaba como se indica en el apartado II.C.16.

Una unidad de actividad nitrato reductasa corresponde a la formación de 1 μmol de nitrito por min en las condiciones del ensayo standard.

II.B.8.2. *Ensayo in situ de la actividad nitrato reductasa*

Las células cuya actividad nitrato reductasa se pretendía determinar, se trataban con tolueno, a fin de permeabilizar sus membranas, permitiéndose la libre circulación de los compuestos necesarios para el ensayo.

Las células, una vez lavadas en el tampón adecuado, se resuspendían en el mismo tampón hasta alcanzar una concentración aproximada de 10-20 μl v.e.c./ml, y se sometían durante 90 s a agitación vigorosa en un Super-mixer en presencia de tolueno a una concentración final del 2% (v/v).

La actividad nitrato reductasa se determinaba en estas células permeables utilizando una cantidad adecuada de la suspensión (usualmente 0,1 ml) y siguiendo las condiciones del ensayo standard.

II.B.8.3. *Ensayo de la actividad nitrato reductasa con ferredoxina reducida enzimáticamente*

La actividad Fd-nitrato reductasa se determinaba usualmente por un procedimiento similar al descrito por Manzano *et al.* (1976), utilizando el sistema NADPH/NADP reductasa como reductor de la ferredoxina.

El ensayo se llevaba a cabo en condiciones aeróbicas, utilizando tubos de 10 ml. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-ClH, pH 8,5, 100 μ moles; NO_3K , 20 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans*, 17,6 nmol ; NADP reductasa purificada de espinacas o de *A. nidulans* cantidad saturante (2 U); NADPH, 1 μmol ; y una cantidad adecuada de nitrato reductasa. La reacción se iniciaba por adición del NADPH y, tras dejarla transcurrir durante 15 min a 30°C, se detenía añadiendo 0,1 ml de acetato bórico 1 M y 2 ml de etanol absoluto frío. El nitrito formado en la reacción se determinaba como se indica en el apartado II.C.16.

II.B.8.4. *Ensayo fotosintético de la actividad nitrato reductasa*

La actividad nitrato reductasa asociada a las preparaciones de membranas obtenidas como se indica en el apartado II.B.3., se ensayó utilizando el par ascorbato/DPIP como donador de electrones para el fotosistema I. El ensayo se llevó a cabo en aerobiosis a 30°C, utilizando un aparato de Warburg que suministraba una intensidad de iluminación de luz blanca de 100 W/m^2 . La mezcla de ensayo, similar a la descrita por Manzano *et al.* (1976), contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-ClH, pH 9,0, 100 μ moles; NO_3K , 20 μ moles;

ferredoxina de *A. nidulans*, 17,6 nmoles; DPIP, 100 nmoles; ascorbato sódico, 10 μ moles; y una cantidad adecuada de la preparación de membranas que llevaba asociada la nitrato reductasa. El periodo de iluminación (tiempo de ensayo) fué de 15 min, determinándose a continuación el nitrito producido, como se indica en el apartado II.C.16. .

II.B.9. Ensayo de la actividad ferredoxina-NADP reductasa

La actividad enzimática ferredoxina-NADP reductasa, tanto del enzima de espinacas, como del de *A. nidulans*, se determinó espectrofotométricamente, siguiendo la reducción de citocromo *c* con NADPH como reductor, a 550 nm. La mezcla de reacción, modificada a partir de la descrita por Shin (1971), contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-ClH, pH 8,5, 100 μ moles; citocromo *c* de corazón de caballo, 129 nmoles; ferredoxina de *A. nidulans*, 17,6 nmoles; NADPH, 2 μ moles; y una cantidad adecuada de enzima.

Para facilitar la localización de la actividad NADP-reductasa en las diferentes fracciones de los eluatos de las columnas, se utilizaba un ensayo cualitativo empleándose placas de porcelana para ensayos múltiples a la gota (12x), y colocando en cada uno de los pocillos 0,6 ml de una mezcla de reacción que contenía: tampón Tris-ClH, pH 8,0, 4,5 μ moles; cloruro de yodonitrotetrazolio, 0,45 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans*, 17,6 nmoles; NADPH, 0,6 μ moles; y una cantidad adecuada de preparación enzimática. El ensayo se iniciaba por

adición del enzima, detectándose la actividad visualmente por la aparición de un color rojo característico. La reacción no era estrictamente dependiente de ferredoxina, si bien su presencia incrementaba fuertemente la velocidad del proceso. De entre las actividades diaforásicas así localizadas, se determinaba posteriormente la correspondiente a la ferredoxina-NADP reductasa por medio del ensayo cuantitativo específico de reducción de citocromo *c* anteriormente descrito.

Una unidad de actividad enzimática correspondía a la reducción de un μmol de citocromo *c* por min en las condiciones de ensayo anteriormente descritas.

II.B.10. Ensayo de otros enzimas

La actividad alcohol deshidrogenasa se determinó espectrofotométricamente a 340 nm por un procedimiento modificado a partir del descrito por Bergmeyer (1974). La mezcla de reacción utilizada contenía en un volumen final de 3 ml : tampón fosfato sódico-glicina, pH 8,8, 281,25 μmoles ; hidrocloreuro de semicarbazida, 275 μmoles ; etanol, 175 μmoles ; NAD^+ , 4,8 μmoles ; y una cantidad adecuada de enzima.

La actividad catalasa se determinó espectrofotométricamente a 240 nm, según el procedimiento de Bergmeyer (1974), ligeramente modificado. La mezcla de reacción empleada contenía en un volumen final de 3 ml: tampón fosfato potásico, pH 7,0, 145 μmoles ; peróxido de hidrógeno, 56,7 μmoles ; y una cantidad adecuada de enzima.

II.C. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

II.C.1. Centrifugaciones

Para la recogida de células, preparación de extractos celulares, y en los distintos pasos de purificación, se emplearon centrífugas refrigeradas SORVALL (U.S.A.) modelo RC2-B con rotores SE12, SS34 y GSA.

Para centrifugación en flujo continuo se empleó el sistema Szent-Gyorgyi-Blum en una centrífuga SORVALL modelo SS-1. Para centrifugar grandes volúmenes se utilizó una centrífuga SHARPLES PENNWALT (Francia) de flujo continuo.

Las centrifugaciones a alta velocidad se llevaron a cabo indistintamente en ultracentrífugas BECKMAN SPINCO (U.S.A.) modelos L2-50B y L2-65B, utilizando un rotor tipo 30.

En las centrifugaciones en gradientes de sacarosa se usó una ultracentrífuga BECKMAN SPINCO modelo L2-50B con un rotor SW 56 Ti de receptáculos basculantes.

II.C.2. Centrifugación en gradientes de sacarosa

Para la formación de los gradientes de sacarosa (5-20% (p/v)) se empleó un aparato mezclador BUCHLER (U.S.A.) de dos compartimentos. Después de llenar el canal de comunicación entre compartimentos con la solución más diluida, se añadieron 2,05 ml de una solución al 5% de sacarosa en Tris-ClH, pH 8,5,

50 mM; ClNa, 0,1 M, en el compartimento más alejado de la salida y 2,05 ml de una solución al 20% de sacarosa en el mismo tampón al compartimento conectado a la salida, agitándose continuamente el contenido de ese compartimento mediante una varilla vibradora. El tubo de salida se mantenía al principio cerca del fondo del tubo de centrifuga y se iba elevando progresivamente, manteniéndolo en contacto con el menisco del líquido, mediante un aparato Densi-Flow de BUCHLER.

Los tubos de centrifuga utilizados fueron BECKMAN tipo 328874, de polialómero, de 1,11 cm x 6,03 cm ($\frac{7}{16}$ " x $2\frac{3}{8}$ ").

Las fracciones se recogieron desde el fondo del tubo mediante el aparato Densi-Flow acoplado a una bomba peristáltica LKB. Típicamente se obtenían 23 fracciones de 3 gotas y una de 2 gotas.

La linealidad de los gradientes en las condiciones utilizadas se comprobó añadiendo DPIP a concentración final de 0,22 mM a la solución más diluida de sacarosa. Tras recoger las fracciones como se ha indicado, se añadió 1 ml de agua a cada una y se determinó su absorbancia a 600 nm. Excepto los cuatro primeros valores, correspondientes a la parte redondeada de la base del tubo, los resultados obtenidos se ajustaban a una recta con un coeficiente de correlación de 1,000.

Para la determinación del coeficiente de sedimentación, se colocó una muestra de 0,1 ml de una mezcla conteniendo nitrato reductasa y proteínas marcadoras en la parte supe -

rior de un gradiente preenfriado a 2°C. La centrifugación se llevó a cabo a 2°C, durante 19 1/2 h y a 45.000 r.p.m. en una centrífuga BECKMAN SPINCO L2-50B empleando un rotor SW 56Ti de receptáculos basculantes.

Las proteínas marcadoras utilizadas fueron ovoalbúmina (0,5 mg por gradiente), alcohol deshidrogenasa (33 µg) y catalasa (5 µg). La ovoalbúmina se detectó por su absorbancia a 230 nm y la alcohol deshidrogenasa y la catalasa por sus actividades catalíticas.

El coeficiente de sedimentación de la nitrato reductasa se calculó por el método de Martin y Ames (1961) utilizando unos valores de coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}$) de 3,55 S, 7,61 S y 11,3 S para la ovoalbúmina, alcohol deshidrogenasa y catalasa respectivamente (Brewer et al., 1974).

II.C.3. Cromatografía en columnas

II.C.3.1. *Cromatografía de de filtración en gel*

Se utilizaron columnas de vidrio calibrado de 15 ó 25 mm de diámetro suministradas por PHARMACIA (Suecia).

Las muestras se aplicaban con una jeringa o, en los casos más críticos, introduciendo la solución con una bomba peristáltica a través de un orificio de la tapa de la columna.

El contenido de proteína de los eluatos se registraba continuamente, midiendo la transmitancia a 280 nm por me -

dio de un aparato Uvicord II de LKB (Suecia).

II.C.3.2. *Cromatografía de afinidad en ferredoxina-Sefarosa*

En este caso se usó una columna de 26 mm de diámetro, limitándose las partes inferior y superior del lecho del gel (16,5 cm de altura) mediante dos émbolos PHARMACIA, aplicándose las muestras directamente sobre el gel a través del émbolo superior.

En los experimentos en pequeña escala se utilizaron columnas de 10 x 80 mm.

II.C.3.3. *Cromatografía de intercambio iónico*

Se empleó DEAE-celulosa DE-52, equilibrada inicialmente con tampón concentrado y reequilibrada posteriormente en la columna con el tampón adecuado. Otras condiciones de utilización fueron las que indica el fabricante. La columna empleada, de 30 mm de diámetro, fué suministrada por ANORSA (España). La altura ocupada por el lecho de DE-52 era de 70 mm.

En la purificación de ferredoxina se utilizó DEAE-Sephadex A-25 hinchado en tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25 mM (T25) y equilibrado en dicho tampón mediante cambios repetidos del mismo y lavado prolongado.

A las suspensiones de geles y de DEAE-celulosa se les eliminó el aire por succión mediante una trompa de agua.

El flujo de líquido en las columnas se regulaba por medio de bombas peristálticas LKB tipo Perpex 10200 de cabezas reductoras intercambiables.

Las fracciones se recogían automáticamente utilizando un colector LKB modelo Ultrorac 7000.

II.C.4. Determinación del radio de Stokes

El radio de Stokes de la nitrato reductasa se estimó mediante cromatografía de filtración en gel, siguiendo el método descrito por Siegel y Monty (1966). Se utilizó una columna conteniendo un lecho de Sephadex G-150 (15 mm x 77,3 cm) al que se añadió en su parte superior Sephadex G-25 (1 cm de altura) a fin de proteger la superficie del lecho de Sephadex G-150. La columna se equilibró en tampón Tris-ClH 50 mM, pH 8,5, ClNa 0,1 M, utilizando una bomba peristáltica LKB a un flujo de 5,39 ml/h.

El volumen vacío (V_0) se determinó filtrando una muestra de 0,3 ml de una solución de azul dextrano al 0,3% (p/v) en tampón de equilibrado suplementado con sacarosa al 1% (p/v). El valor promedio de tres determinaciones fue de 50,31 ml. El volumen total (V_t) se estimó como 122,0 ml mediante calibrado con agua. Los volúmenes de elución (V_e) se calculaban a partir del peso del líquido correspondiente y de la densidad del mismo (1,00462 g/ml).

Las proteínas utilizadas como marcadores, así como los radios de Stokes considerados, fueron: alcohol deshidro-

genasa de levadura, 45 Å; seroalbúmina bovina, 35,5 Å; ovoalbúmina, 27,3 Å; y citocromo c de corazón de caballo, 10 Å.

La alcohol deshidrogenasa y la nitrato reductasa se localizaban por su actividad catalítica, tal como se indica en los apartados II.B.10 y II.B.8.1. respectivamente. La seroalbúmina y quimotripsinógeno se detectaron por su absorbancia a 230 nm, el citocromo a 410 nm, y el azul dextrano a 620 nm.

Las cantidades de marcadores aplicados fueron: alcohol deshidrogenasa, 197 U; seroalbúmina, 1,8 mg; ovoalbúmina, 3 mg; quimotripsinógeno, 1 mg; y citocromo c, 1 mg. Las muestras, disueltas en 0,3 ml de tampón de equilibrado suplementado con sacarosa el 1% (p/v), se aplicaron con jeringa. Se tomaron fracciones cada 12 min excepto en el caso de la seroalbúmina, en que fueron cada 10 min (aprox. 1,08 y 0,90 ml respectivamente). Los resultados se trataron según Lauren y Killander (1964), representando $(-\log K_{av})^{1/2}$, donde $K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$, en función del radio de Stokes.

II.C.5. Determinación del peso molecular por filtración en gel

El peso molecular de la nitrato reductasa se estimó mediante cromatografía de filtración en gel siguiendo el método de Andrews (1964) utilizando una columna de Sephadex G-150 de las mismas características e idénticas condiciones experimentales a las descritas en el apartado anterior.

Las proteínas utilizadas como patrones, así como

los pesos moleculares considerados fueron: alcohol deshidrogenasa, 150.000; ovoalbúmina, 45.000; quimotripsinógeno A, 25.000; y citocromo *c*, 12.400.

II.C.6. Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida

Se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 7,5% de acrilamida (p/v) siguiendo los métodos descritos por Maurer (1971) con algunas modificaciones, y suprimiendo el gel espaciador.

En las separaciones a pH 8,0, el tampón de gel utilizado fue Tris-ClH, pH 7,5, 0,57 M, conteniendo N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) al 0,5% (v/v). El tampón de electrodo empleado fue Tris-barbital, pH 7,0, 38,2 mM. Cuando el pH para la separación electroforética fue de 9,5, el tampón de gel fue Tris-ClH, pH 8,9, 30 mM, conteniendo 0,05% (v/v) de TEMED, siendo el tampón de electrodo Tris-glicina, pH 8,3, 43,3 mM.

Para la preparación de los geles se mezclaron 2 vol de solución de acrilamida (acrilamida 30% (p/v) y bisacrilamida 0,8% (p/v)), 1 ó 2 vol de tampón de gel (sistemas de pH 9,5 ó 8,0 respectivamente) y agua hasta 8 vol. Después de eliminar los gases disueltos mediante succión con una trompa de agua, se le añadió a la mezcla 0,05 vol de persulfato amónico 65,7 mM y se dejó polimerizar en tubos de vidrio de 5 mm de diámetro interno y 7,5 cm de longitud, llenándolos hasta aproximadamente 1 cm del extremo superior y cubriendo el

menisco con una capa de agua de 2-3 mm. Antes de usarse, los tubos de vidrio empleados se sumergían, hasta 1 cm de su extremo superior, en una disolución al 5% (v/v) de diclorodimetilsilano en benceno. El disolvente se evaporaba a 60°C, quedando el tubo recubierto por una capa hidrófoba deslizante que facilitaba la extracción del gel una vez concluida la electroforesis (Lorentz, 1976).

Para mejorar la aplicación de las muestras, se incrementaba su densidad añadiéndoles sacarosa hasta el 33% de saturación. El colorante utilizado como marcador del frente de electroforesis fué azul de bromofenol al 0,05% (p/v) en Tris-ClH, pH 7,5, 5 mM. La electroforesis se realizaba a 2-4°C manteniendo una intensidad constante de 2 mA por tubo durante los 15 primeros min y luego de 4 mA por tubo durante el periodo, de aproximadamente 1 h, necesario para que el frente de la electroforesis alcanzase el extremo inferior del tubo (polo positivo).

II.C.7. Densitogramas

Los densitogramas de los geles de poliacrilamida sometidos a electroforesis se realizaron en un espectrofotómetro PYE UNICAM (Inglaterra) SP8-100 UV equipado con un densitómetro modelo 790826.

Los geles, una vez teñidos, se colocaban en un tubo de vidrio calibrado de 0,5 mm de diámetro interno, midiéndose la absorbancia a 600 nm a lo largo del gel, el cual se despla

zaba a una velocidad de 0,2 ó 0,4 mm/s. La velocidad del registrador era de 20 ó 10 s/cm de forma que la expansión total del registro fuese de 4 mm/cm. Otros parámetros utilizados fueron los siguientes: intervalo de absorbancia, de 0 a 2; atenuadores, todos; rendija horizontal, 2 mm; rendija vertical izquierda, 0,2 mm; y temperatura, ambiente.

II.C.8. Tinción de proteína en geles de poliacrilamida

Para localizar las proteínas en los geles de poliacrilamida sometidos a electroforesis, éstas se teñían por inmersión de los geles en una solución de Azul brillante Coomassie G al 1% (p/v) en ácido acético al 7,5% (p/v) y metanol 50% (v/v). Tras 2 h de tinción, los geles se lavaban dos veces con una solución de ácido acético al 7,5%, y luego se transferían a tubos con ácido acético al 7,5% a los que se añadía una pequeña cantidad de resina Dowex 50 WX2. Los tubos se mantenían en agitación a 75 r.p.m. en un incubador orbital a 27°C durante 12 h aproximadamente, hasta conseguir el desteñido de los geles.

II.C.9. Localización de la actividad nitrato reductasa en geles

Para detectar la actividad MV-nitrato reductasa en geles de poliacrilamida se siguió un procedimiento similar al empleado por Hucklesby y Hageman (1973) para la nitrito reductasa.

Los geles se introducían en mezcla de ensayo sin nitrato, se añadía el ditionito y, tras 10 min de incubación a temperatura ambiente, se transferían a tubos de ensayo que contenían 20 mM de NO_3K , los cuales se incubaban a 30°C . En los geles, que inicialmente presentaban el color azul del metilviológeno reducido, la nitrato reductasa se hacía patente como una banda incolora originada por la oxidación, catalizada por el enzima, del metilviológeno reducido por el nitrato. Una vez localizada, la banda de actividad nitrato reductasa podía "fijarse" transfiriendo los geles a una solución al 2,5% (p/v) de cloruro de trifeniltetrazolio, el cual reacciona con la forma reducida del metilviológeno dando lugar a un derivado formazano insoluble, de color rojo. La actividad nitrato reductasa se manifestaba entonces como una banda incolora frente al color rojo del resto del gel.

El mismo gel podía utilizarse para localizar actividad y proteína. Para ello, tras la aparición de la banda incolora provocada por la actividad del enzima, se marcaba su posición atravesando el gel con un hilo de cobre y se procedía a continuación a teñir la proteína por el procedimiento descrito anteriormente.

II.C.10. Localización de la actividad NADP reductasa en geles de poliacrilamida

La actividad NADP reductasa se detectó por un procedimiento derivado del ensayo con yodonitrotetrazolio descrito anteriormente (apartado II.B.9.). Para ello, se sumergía el

gel en una disolución 0,75 mM de yodonitrotetrazolio y 29,5 μ M de ferredoxina en tampón Tris-ClH, pH 8,0, 12 mM. Tras 10 min de incubación a 30°C, se desencadenaba la reacción añadiendo NADPH a una concentración final de 1 mM. Las bandas con actividad NADP reductasa tomaban color rojo como consecuencia de la actividad enzimática. Pese a la preincubación, la lenta difusión de la ferredoxina hacia el interior del gel hacía que la parte coloreada tuviese forma de anillo, apareciendo teñidas más intensamente las zonas superficiales del gel.

II.C.11. Determinación del peso molecular por electroforesis en SDS

La electroforesis en SDS se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 7,5% de acrilamida (p/v) siguiendo el procedimiento descrito por Weber y Osborn (1975).

El tampón de gel utilizado fué de fosfato sódico 0,2 M conteniendo SDS (dodecilsulfato sódico) al 0,2% (p/v). El tampón de muestra consistía en fosfato sódico 20 mM, pH 7,2, conteniendo SDS al 20,2% (p/v); β -mercaptoetanol al 2% (v/v) y glicerol al 20% (v/v). El tampón de electrodo se obtuvo diluyendo 1 vol de tampón de gel con 1 vol de agua. Para preparar los geles se mezclaron: 7,5 ml de solución de acrilamida (acrilamida 30% (p/v) y bisacrilamida 0,8% (p/v)), 15 ml de tampón de gel, 6,72 ml de agua y 30 μ l de TEMED. Después de eliminar los gases disueltos en la solución, se añadió 0,75 ml de persulfato amónico 65,7 mM, y se dejó po-

limerizar en tubos de vidrio de 5 mm de diámetro interno y 10 cm de longitud, llenándolos hasta aproximadamente 1 cm del extremo superior y cubriendo el menisco con una capa de agua de 2-3 mm.

Las proteínas patrones se disolvieron en Tris-ClH 25 mM, pH 8,5, a las concentraciones que se indican: fosforilasa *a*, 2 mg/ml; seroalbúmina bovina, 0,25 mg/ml; ovoalbúmina, 0,5 mg/ml; y quimotripsinógeno, 1 mg/ml. El azul de bromofenol (marcador del frente de electroforesis) se preparó al 0,05% (p/v) en el mismo tampón. Para preparar las muestras, éstas se diluyeron al doble con el tampón de muestra y se calentaron a 100°C durante 3 min. Una vez enfriadas, se aplicaron (5 µl de cada muestra) a sus correspondientes geles con ayuda de una microjeringa. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, aplicando durante los primeros 30 min una intensidad de 4 mA por tubo, y posteriormente 8 mA por tubo hasta que la banda del bromofenol se aproximó al extremo del gel (aproximadamente 4 h).

La tinción de las proteínas se realizó como se ha descrito en el apartado II.C.8.

La movilidad electroforética de cada proteína se determinó midiendo la distancia recorrida por ella y dividiéndola por la longitud total del gel (93 mm) o bien por la distancia correspondiente al marcador más ligero (quimotripsinógeno).

Los pesos moleculares de los marcadores fueron los

descritos por Weber y Osborn (1969), a saber: fosforilasa α , 94.000 D; seroalbúmina bovina, 68.000 D; ovoalbúmina, 43.000 D; y quimotripsinógeno de páncreas bovino, 25.700 D.

La representación gráfica de los resultados se llevó a cabo colocando en ordenadas el logaritmo de los pesos moleculares y en abcisas la movilidad electroforética relativa al quimotripsinógeno.

II.C.12. Determinaciones espectrofotométricas

Las determinaciones colorimétricas se realizaron empleando espectrofotómetros BAUSCH & LOMB modelo Spectronic 100 ó PYE UNICAM SP 1750 UV dotados ambos de salida digital. Las cinéticas enzimáticas se siguieron mediante aparatos PYE UNICAM modelos SP 1800 UV o SP 1750 UV con registrador incorporado. Los espectros de absorción se obtuvieron utilizando espectrofotómetros PYE UNICAM modelo SP8-100 UV ó SP 1750 UV indistintamente o bien AMINCO (U.S.A.) modelo DW 2a. Con excepción del espectrofotómetro BAUSCH & LOMB, todos los aparatos utilizados eran del tipo de doble haz y podían ser empleados en medidas tanto dentro de la zona visible como de la ultravioleta.

Los coeficientes de extinción milimolar, $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}}$, considerados fueron: citocromo c (reducido menos oxidado), a 550 nm = 19,6 (Yonetani, 1965); NAD(P)H, a 340 nm = 6,22; NADPH, a 363 nm = 3,47; NAD(P)⁺, a 260 nm = 18,0; 3-acetilpiridina NAD(P)⁺, a 260 nm = 16,4; 3-acetilpiridina NADH, a 363 nm = 9,1; 3-acetilpiridina NADH, a 340 nm = 6,19. Los valores co

rrespondientes a los piridín nucleótidos y a sus análogos se tomaron de P-L Biochemicals (1973).

En las determinaciones de ovoalbúmina, seroalbúmina y quimotripsinógeno llevadas a cabo a longitudes de onda de 230 nm; de peróxido de hidrógeno, a 240 nm; de citocromo *c*, a 410 nm; y de azul dextrano, a 620 nm, no se consideraron coeficientes de extinción por ser medidas de tipo comparativo.

II.C.13. Determinación de clorofila

La clorofila se determinó siguiendo el método de Arnon (1949). A una alícuota de la preparación, generalmente 0,1 ml, se añaden 20 ml de acetona al 80% (v/v) y tras 10 min de extracción se filtraba y se medía la absorbancia del filtrado a 652 nm. El valor de la concentración de clorofila se calculaba utilizando un $E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}} = 34,5$.

Todo el proceso se hacía protegiendo la clorofila de la luz.

II.C.14. Valoración del ditionito sódico

Para determinar la concentración de ditionito sódico en las disoluciones, se midió en condiciones anaeróbicas la disminución de absorbancia a 450 nm de una disolución de FAD 0,126 mM en tampón fosfato potásico, pH 7,0, 0,1 M, al añadir cantidades conocidas de la disolución de ditionito. Los cálculos se realizaron asumiendo una relación molar de

FAD reducido/ditionito añadido de 1:1, y utilizando unos coeficientes de extinción milimolar, $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}}$, para el FAD, a 450 nm, de 11,3 (oxidado) ó 10,2 (oxidado menos reducido) según describen Cerletti y Caiafa (1971).

II.C.15. Determinación de NADPH

El NADPH se determinó espectrofotométricamente a 340 nm utilizando un coeficiente de extinción milimolar, $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}}$, igual a 6,22. Para evitar interferencias en la determinación del NADPH en preparaciones turbias o conteniendo cantidades elevadas de proteína, se tomaba una alícuota de la preparación y se llevaba al 67% de saturación con sulfato amónico saturado, pH 8,2. Tras centrifugar a 48.000 x *g* durante 15 min a 0°C se tomaba una alícuota del sobrenadante clarificado y se procedía como se ha indicado anteriormente, utilizando un blanco sometido al mismo tratamiento.

II.C.16. Determinación de nitrito

El nitrito se determinó mediante la reacción de diazotación de Griess-Ilosway según el procedimiento descrito por Snell y Snell (1949).

A 1 ml de muestra se le añadía 1 ml de una disolución 58 mM de sulfanilamida en ClH 2,4 N y 1 ml de una disolución 0,69 mM de NNEDA. Transcurridos 10 min, se le añadían 2 ml de H₂O y se determinaba la concentración de complejo coloreado, utilizando un coeficiente de extinción a 540 nm

$$E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} = 55.$$

Cuando fué necesario determinar nitrito en presencia de piridín nucleótidos, se siguió el método de Medina y Nicholas (1957) a fin de evitar interferencias con la formación del complejo coloreado. A 1 ml de muestra se le añadían 0,1 ml de acetato bórico 1 M y 2 ml de etanol absoluto frío. Tras mantener la mezcla 5 min a 0°C, se centrifugaba a 2.000 x g, durante 5 min, utilizándose 1 ml del sobrenadante para la determinación de nitrito por el procedimiento descrito anteriormente.

Para evitar la interferencia causada por el ascorbato en la determinación del nitrito producido en los ensayos fotosintéticos, a las correspondientes mezclas de reacción se les añadió, una vez finalizado el ensayo, 0,1 ml de NaOH 1 N y se calentaron a 80°C durante 10 min. Una vez destruido el ascorbato mediante este tratamiento (Katoh, 1963), la turbidez se eliminaba por adición de 0,1 ml de SO_4Zn 1 M y centrifugación a 2.000 x g durante 3 min. Del sobrenadante, ya clarificado, se tomaba una alícuota en la que se determinaba el nitrito según se ha indicado.

II.C.17. Determinación de protefna

La protefna se estimó por el método de Lowry *et al.* (1951) con las modificaciones de Bailey (1967).

La curva de calibrado preparada con seroalbúmina bovina se ajustaba a la ecuación:

$$A_{750 \text{ nm}} = 0,0079 \cdot (\mu\text{g protefina})^{0,8496}$$

con un coeficiente de correlación de 0,997. El procedimiento permitía la estimación de cantidades de proteínas entre 25 y 200 μg . Para cantidades de proteína inferiores (5 a 40 μg), se utilizó el mismo método pero modificado para obtener un volumen final de 0,8 ml en lugar de 4 ml. El ajuste de los patrones se hizo, en este caso, a una recta de ecuación:

$$A_{750} = 0,0026 + 0,0049 \cdot (\mu\text{g protefina}) \quad (r^2 = 0,993)$$

Para la determinación rutinaria de la proteína presente en preparaciones muy diluidas (eluatos de columnas, etc.), se utilizó el método espectrofotométrico de Warburg y Christian (1941), donde:

$$\text{mg protefina} = 1,55 A_{280} - 0,76 A_{260}$$

En las preparaciones que contenían ditionito sódico, éste se oxidó, por agitación suave, previamente a la determinación de proteína.

La concentración de ferredoxina se calculó a partir de su absorbancia a 420 nm, considerando $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} = 6,5$ (Yamanaka *et al.*, 1969), y la de flavodoxina empleando el coeficiente de extinción milimolar, $E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}} = 9,2$ a 465 nm, descrito por Smillie y Entsch (1971).

II.C.18. Determinación del volumen de células empaquetadas (v.c.e.)

Para ello se colocaba una alícuota de 6 ml de la suspensión de células en un tubo hematocrito graduado, especialmente fabricado por AFORA (España), y se centrifugaba a $2.000 \times g$ durante 15 min. Tras resuspender las células que quedaban adheridas a la pared de la parte superior del tubo, se volvía a centrifugar en las mismas condiciones. El volumen de las células sedimentadas se determinaba en la escala del hematocrito.

II.C.19. Determinación de intensidades de iluminación

Se llevaron a cabo utilizando un medidor de YELLOW SPRINGS INSTRUMENTS (U.S.A.) modelo Radiometer 65A equipado con un sensor Radiometer 6551, que suministraba una salida constante en el intervalo de 280 a 2.600 nm.

II.C.20. Medida de flujos gaseosos

Para preparar la mezcla de aire y CO_2 en las proporciones adecuadas, así como para determinar el caudal de gas que se suministraba a los cultivos, se utilizaron un contador de gases KROMSCHROEDER (España) modelo NB-2 en la medida de aire y de gas total, y un medidor VEB Prufgerate-WERK MEDINGEN (R.F.A.) tipo TG-300 para el CO_2 .

II.C.21. Medidas del pH

El pH de las disoluciones se determinó con pHmetros BECKMAN (U.S.A.) modelo Expandomatic SS2 o METHROM HERISAU (R.F.A.) modelo E-512, ambos provistos de escala expandida.

II.C.22. Concentración de proteínas

La concentración de proteínas se realizó en una célula de ultrafiltración con agitación AMICON (U.S.A.) modelo 52, provista de una membrana DIAFLO PM-10 de 47 mm de diámetro, que retiene los compuestos de peso molecular superior a 10.000 D. Para forzar el paso del líquido a través de la membrana, se aplicó indistintamente argón o nitrógeno a una presión de $0,4 \text{ kg/cm}^2$.

En algunos casos, la concentración se llevó a cabo mediante liofilización en un aparato EDWARDS (Inglaterra) modelo EF 03.

II.C.23. Eliminación de sales

Las sales se eliminaron generalmente por filtración de los extractos enzimáticos a través de columnas de Sephadex G-25 (medium), o bien por diálisis utilizando tubos de celulosa regenerada Visking (SERVA, R.F.A.) de 21 mm de diámetro. La membrana de celulosa, de un espesor de $25 \mu\text{m}$, tenía un tamaño de poro de $15-20 \text{ \AA}$, siendo el límite de exclusión de 10.000 a 20.000 D.

II.C.24. Establecimiento de condiciones anaeróbicas

Para la obtención de una atmosfera carente de oxígeno necesaria en algunos experimentos, se utilizó un aparato "MANIFOLD" que permitía realizar con facilidad ciclos sucesivos de evacuado de atmósfera inicial y llenado con un gas carente de oxígeno a un total de 12 recipientes al mismo tiempo.

Las muestras, 0,5 ml, se colocaban en tubos de ensayo de 10 ml de capacidad, BECTON-DICKINSON (U.S.A.) Vacutainer 4670 F con tapón de goma, los cuales se conectaban a las salidas del aparato sometiéndolos a continuación a 5 ciclos de vacío-llenado de argon de dos más dos minutos cada uno. El gas, de alta pureza se hacía pasar previamente a través de un catalizador BASF (R.F.A.) R3-11 calentado a 60°C, para eliminar cualquier traza de oxígeno. El orificio producido en el tapón al ser atravesado por la aguja de conexión se recubría con grasa de silicona MERCK.

En los experimentos en que se llevaron a cabo determinaciones espectrofotométricas en ausencia de oxígeno, se emplearon tubos de vidrio óptico, BAUSCH & LOMB (U.S.A.) de 10 mm de diámetro, cerrados con tapones de goma de los que equipan los tubos B-D Vacutainer 4827. El procedimiento seguido para la consecución de condiciones anaeróbicas fue similar al descrito anteriormente con excepción de la duración de los ciclos, tres más tres min en este caso, debido al mayor volumen de la muestra (2 ml).

Tanto la toma de muestra como la adición de compuestos se llevó a cabo empleando jeringas herméticas HAMILTON (Suiza), de la capacidad adecuada para cada caso.

II.D. REACTIVOS

II.D.1. Procedencia de los compuestos químicos y bioquímicos

Los siguientes compuestos: Azul Coomasie, Tris, ascorbato sódico, FAD, FMN, lumiflavina, análogos de piridín nucleótidos, y azul-Sefarosa Cl6B, así como las proteínas ADH, cat., F.a., glucosa oxidasa, lisozima y ovoalbúmina se obtuvieron de SIGMA (U.S.A.). Los piridín nucleótidos y el citocromo *c* de BOEHRINGER (Alemania). El Bio Gel HTP procedía de BIO RAD LABORATORIES (U.S.A.), y BSA, BV, INT, MV, QT y TEMED, de SERVA (Alemania). Ferrozina y bisacrilamida de ALDRICH (Bélgica). El ultrogel Aca 44 procedía de LKB (Suecia). Los geles Sephadex G-25, G-100, G-150, DEAE-Sephadex A-25, A-50 y CNBr-Sefarosa 4B, así como el azul dextrano 2.000, se obtuvieron de PHARMACIA (Suecia). La DEAE-celulosa DE-52, de WHATMAN (Inglaterra). El agar se adquirió a DIFCO (U.S.A.). El NO_3K y el PO_4HK_2 empleados en los cultivos a gran escala fueron de grado analítico y suministrados por PANREAC (España). El resto de los compuestos utilizados fueron de grado analítico y procedían de MERCK (Alemania).

El agua destilada se obtuvo mediante un destilador de vidrio DRA (España). Los gases utilizados, anhídrido carbónico, nitrógeno y argón, eran de alta pureza y fueron ad-

quiridos a la S.E.O. (España).

La 5-deazarriboflavina fué facilitada por el Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. El sulfo-DSPD fué un obsequio del Prof. A. Trebst, Bochum (R.F.A.).

Las células secas de *Spirulina maxima* utilizadas en la preparación de ferredoxina fueron suministradas gratuitamente por SOSA TEXCOCO (Méjico). El suero anti-nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* fué un obsequio de la Prof. B. Vennesland, Berlin (R.F.A.).

III. RESULTADOS

III.A. LA FERREDOXINA REDUCIDA COMO DONADOR FISIOLÓGICO DE ELECTRONES PARA LA REDUCCIÓN DEL NITRATO EN *Anacystis nidulans*

Se presentan en este apartado evidencias que sustentan la propuesta de que la ferredoxina es el compuesto fisiológico que *in vivo* lleva a cabo la transferencia de electrones desde el aparato fotosintético a la nitrato reductasa, pudiendo ser reemplazada en esta función por la flavodoxina, en condiciones de deficiencia de hierro en el medio. Se revisa la posibilidad de que los piridín nucleótidos sirvan como donadores de electrones para la nitrato reductasa de cianobacterias, tal como han sugerido otros autores, demostrándose la participación de la ferredoxina en los sistemas donde el NAD(P)H actúa como aparente reductor directo del enzima. Se describen dos nuevos sistemas de reducción de ferredoxina que pueden acoplarse de forma efectiva a la reducción de nitrato catalizada por la ferredoxina-nitrato reductasa de *A. nidulans*

III.A.1. Efecto de los inhibidores de la reducción de ferredoxina sobre la fotorreducción de nitrato por partículas de *A. nidulans*

Mediante la utilización de diversos compuestos que afectan a la reducción fotosintética de ferredoxina, se ha corroborado la participación de esta proteína en la ruta de reducción de nitrato en preparaciones de membranas de *A. ni-*

dulans con actividad fotosintética.

La Tabla I compara el efecto producido por el metilviológeno sobre la reducción, dependiente de ferredoxina, de NADP^+ (Forti, 1977) y nitrito (Losada y Guerrero, 1979), con el ejercido sobre la reducción de nitrato. Puede observarse que la inhibición causada por el drenaje de electrones que efectúa el metilviológeno es del mismo orden en los tres sistemas.

Se han empleado otros inhibidores de la fotorreducción de ferredoxina, como el N,N'-disaliciden-1,3-diaminopropano disulfonato (Sulfo-DSPD) y el pirofosfato (Izawa, 1977), así como posibles competidores del nitrato por los electrones de la ferredoxina reducida, tales como el NADP^+ , observándose en todos estos casos fuertes inhibiciones de la fotorreducción de nitrato. Sin embargo, estas inhibiciones pueden explicarse, al menos en parte, por un efecto directo de estos compuestos sobre la nitrato reductasa (véase apartado III.G.).

III.A.2. Dependencia por ferredoxina o flavodoxina de la reducción fotosintética de nitrato llevada a cabo por preparaciones de membranas de *A. nidulans* con actividad nitrato reductasa

Las preparaciones de membranas fotosintéticas obtenidas de células de *A. nidulans* como se indica en el apartado II.B.3., llevaban a cabo la reducción fotosintética de nitrato utilizando el par ascorbato/DPIP como donador de elec-

TABLA I

EFEECTO INHIBIDOR DEL METILVIOLOGENO SOBRE LA REDUCCION
FOTOSINTETICA DE NADP^+ , NITRATO Y NITRITO POR
PARTICULAS DE *A. nidulans*

Adición	Actividad relativa (%) de fotorreducción de		
	<u>NADP^+</u>	<u>Nitrato</u>	<u>Nitrito</u>
Ninguna	100	100	100
Metilviológeno 2 mM	9,7	10,5	23,4

En la fotorreducción de nitrato y NADP^+ se utilizó una mezcla de reacción que contenía: Tris-ClH, pH 8,5, 50 mM; NO_3K ó NADP^+ , 10 mM y 2 mM respectivamente; ferredoxina de *A. nidulans*, 17,6 μM ; preparación particulada, 138 $\mu\text{g/ml}$; DPIP, 0,2 mM; ascorbato sódico, 20 mM. El volumen de reacción fue de 1 ml en el caso del nitrato, y 2 ml en el del NADP^+ . En la fotorreducción de nitrito, el tampón empleado fue Tris-ClH, pH 7,5, 50 mM; el NO_2Na que sustituía al NO_3K o al NADP^+ , iba a una concentración 1,5 mM. Volumen final, 1 ml. El resto de las condiciones fueron como en los casos anteriores. Tiempo de ensayo, 30 min. Iluminación, luz blanca 100 W/m^2 . El 100% de actividad correspondiente a reducción de NADP^+ , nitrato y nitrito fue de 1.145, 158 y 709 nmoles respectivamente.

trones del fotosistema I (Manzano *et al.* 1976). La reacción parecía ser dependiente de ferredoxina, aunque incluso sin añadir esta proteína a la mezcla de reacción se observaba una actividad apreciable de reducción de nitrato (aproximadamente el 10% de la obtenida con el sistema completo). Este hecho se supuso que era debido a la presencia de una cierta cantidad de ferredoxina endógena en la preparación particulada. A fin de clarificar este extremo, se sometieron las partículas a un lavado exhaustivo con el tampón de resuspensión y se estudió, entonces, su dependencia por ferredoxina. La Tabla II muestra que en ausencia de ferredoxina la velocidad de la reacción es extremadamente baja, obteniéndose un estímulo del orden de 5 veces tras la adición de sólo 2 μM de ferredoxina. La estimulación es aún más notable en presencia de niveles de ferredoxina 20 μM . En la misma tabla puede observarse que la adición de flavodoxina de *A. nidulans*, sustituto fisiológico de la ferredoxina en condiciones de crecimiento de las células en medios pobres en hierro (Smillie y Entsch, 1971), produce también un notable incremento de la actividad de fotorreducción de nitrato.

III.A.2.1. *Efecto de la concentración de ferredoxina sobre la fotorreducción de nitrato por preparaciones de membranas de A. nidulans*

Como se ha visto en la Tabla II, la ferredoxina estimula grandemente la fotorreducción de nitrato llevada a cabo por partículas fotosintéticas de *A. nidulans*. La Figura 2

TABLA II

EFFECTO DE FERREDOXINA Y FLAVODOXINA EN LA REDUCCION FOTOSINTETICA
DE NITRATO POR PARTICULAS DE *A. nidulans*

Transportador	Concentración (μM)	Nitrito formado (nmoles)
Ferredoxina	0	2,7
	2	15,9
	21	65,1
Flavodoxina	0	2,7
	5	5,5
	50	30,0

Las condiciones fueron las descritas en el apartado II.B.8.4., excepto que el tiempo de ensayo fue de 25 min y que se añadió el transportador a la concentración que se indica. La preparación particulada de nitrato reductasa contenía 25,8 μg de clorofila.

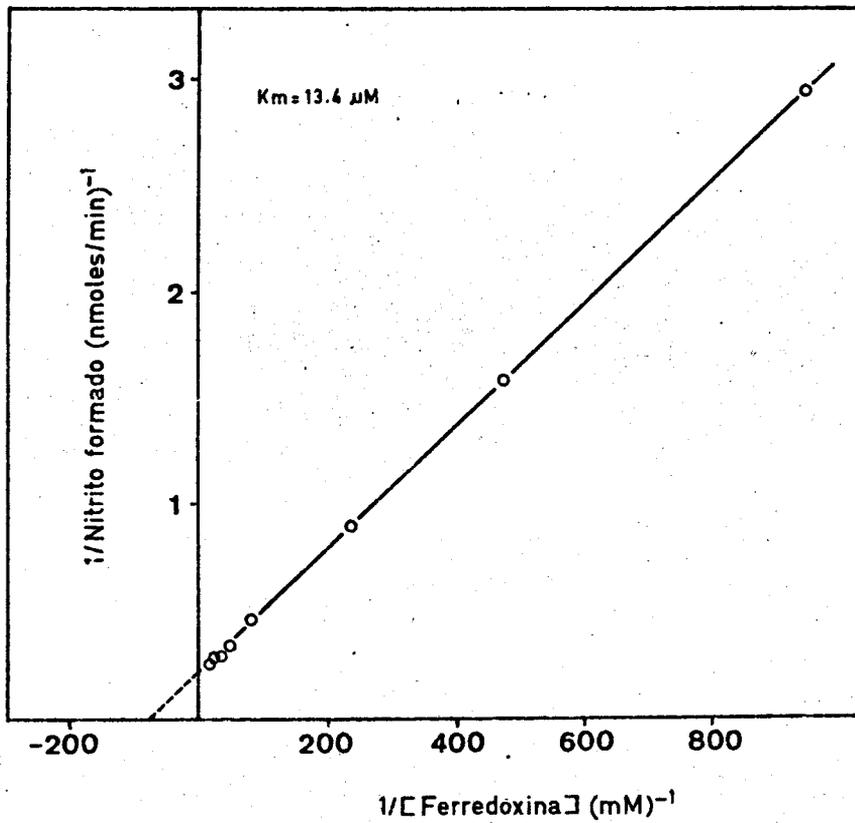


FIGURA 2. K_m para la ferredoxina de la nitrato reductasa particulada de *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las que se describen en el apartado II.B.8.4. para el ensayo fotosintético de actividad nitrato reductasa, excepto que las concentraciones de ferredoxina de *A. nidulans* fueron las que se indican. Nitrato reductasa particulada conteniendo $26 \mu\text{g}$ de clorofila.

muestra la representación de Lineweaver-Burk del efecto de la concentración de ferredoxina sobre la velocidad de fotorreducción de nitrato. El valor calculado de K_m para la ferredoxina, $13,4 \mu\text{M}$, reduciendo la proteína fotosintéticamente iluminando, en presencia del par ascorbato/DPIP, preparaciones de membranas que llevan asociada la nitrato reductasa, es similar al determinado, $14 \mu\text{M}$, cuando la ferredoxina se reducía mediante el sistema auxiliar NADPH/NADP reductasa de espinacas y se utilizaba nitrato reductasa de *A. nidulans* parcialmente purificada (Manzano, 1977).

III.A.2.2. *Efecto de la concentración de flavodoxina sobre la fotorreducción de nitrato por preparaciones de membranas de A. nidulans*

Al igual que en el caso de la ferredoxina, se ha estudiado la afinidad que presenta la nitrato reductasa particulada por la flavodoxina reducida fotosintéticamente.

En la Figura 3 se muestra la representación de los inversos de concentración de flavodoxina y de las velocidades correspondientes, habiéndose calculado, a partir de estos datos, una K_m para la flavodoxina de $44,1 \mu\text{M}$. Los valores de K_m y V_{max} para la flavodoxina son, respectivamente, 3 veces superior y 5 veces inferior a los determinados para la ferredoxina en las mismas condiciones.

La eficiencia de la flavodoxina como transportador de electrones en la reducción fotosintética del nitrato, per-

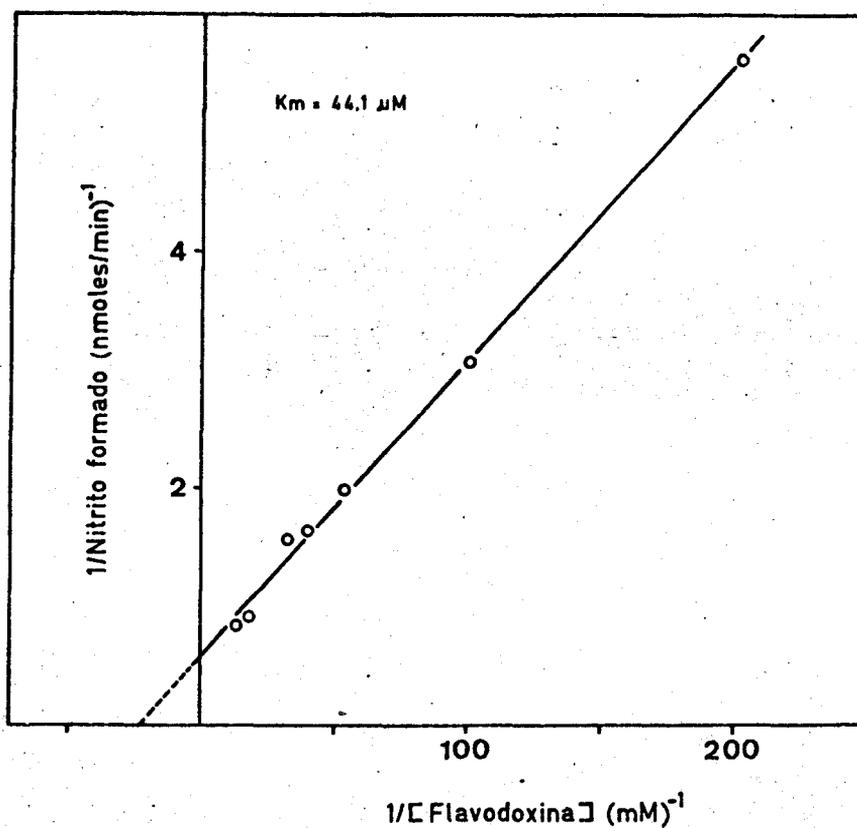


FIGURA 3. K_m para la flavodoxina de la nitrato reductasa particulada de *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que en Figura 2, excepto que la ferredoxina se sustituyó por flavodoxina a las concentraciones que se indican.

mite atribuirle a esta protefna un papel de sustituto fisiológico de la ferredoxina para la fotorreducción de nitrato en condiciones de carencia de hïerro, al igual que ocurre con otras reacciones dependientes de ferredoxina (Bothe, 1977).

III.A.3. NAD(P)H como aparente donador de electrones para la nitrato reductasa de *A. nidulans*

Preparaciones particuladas de nitrato reductasa de la cianobacteria *Anabaena cylindrica*, obtenidas por tratamiento de las células con acetona, llevan a cabo la reducción de nitrato a nitrito con NADH como donador de electrones independientemente de la adición o no de ferredoxina (Hattori y Myers, 1967).

Cuando una preparación de nitrato reductasa de *A. nidulans*, parcialmente purificada (fracción de etanol de la purificación general), se ensayó con NADH como posible donador de electrones, se obtuvieron los resultados expuestos en en la Tabla III. Puede observarse que la preparación reduce nitrato con la única adición de NADH, si bien al añadir ferredoxina y NADP reductasa se incrementaba al doble la velocidad de la reacción. En ausencia de NADH no se detecta reducción de nitrato.

A fin de eliminar la posibilidad de que la actividad observada con NADH fuese debida a la presencia simultánea de ferredoxina y NADP reductasa en la preparación de nitrato reductasa utilizada, se repitió el experimento empleando la mis

TABLA III

NADH COMO DONADOR DE ELECTRONES PARA LA REDUCCION DE NITRATO
 POR UNA PREPARACION ENZIMATICA DE *A. nidulans*

Adición	Nitrito formado (nmoles)
Ninguna	0
NADH	15,4
NADH, Fd, NADP reductasa	30,6

El sistema contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-ClH, pH 8,5, 100 μ moles; NO_3K , 20 μ moles; nitrato reductasa parcialmente purificada, 0,4 mg. Donde se indica se añadió: NADH, 2 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans*, 17,6 nmoles y NADP reductasa de *A. nidulans*, 125 mU. Otras condiciones como en el apartado II.B.8.3.

ma preparación pero tras eliminar de ella la ferredoxina por adsorción a DEAE-celulosa (eluato de DE 52 de la purificación general, véase apartado III.D.1.3.). Los resultados que se presentan en la Tabla IV muestran que, en estas condiciones, el NADH no es capaz de donar electrones a la nitrato reductasa tanto sólo como en presencia de NADP reductasa, (líneas 1 y 2), necesitándose el concurso conjunto de ferredoxina y NADP reductasa. El requerimiento de ferredoxina para que la reacción tenga lugar es absoluto, tanto utilizando NADH (líneas 2 y 3) como NADPH (líneas 4 y 5) como donador de electrones. Puede observarse que la velocidad de reducción de nitrato con NADPH (línea 5) es del orden de 6 veces superior a la obtenida con NADH (línea 3), lo que probablemente se debe a la mayor afinidad que por el NADPH presenta la NADP reductasa. La reacción de reducción de la ferredoxina, que con NADPH funciona a saturación, se hace limitante al usar NADH como donador de electrones.

La reducción de nitrato por los piridín nucleótidos reducidos llevada a cabo por estas preparaciones de nitrato reductasa sólo parcialmente purificadas es debida, por tanto, a la presencia de contaminantes capaces de transferir los electrones desde el NAD(P)H a la ferredoxina y, consecuentemente, a la nitrato reductasa.

III.A.4. La ferredoxina reducida químicamente como donador de electrones para la nitrato reductasa de *A. nidulans*

La ferredoxina-nitrato reductasa de *A. nidulans* pue

TABLA IV

REQUERIMIENTO DE FERREDOXINA PARA LA REDUCCION DE NITRATO CON
EL SISTEMA NAD(P)H/NADP REDUCTASA POR UNA PREPARACION
ENZIMATICA DE *A. nidulans* CARENTE DE FERREDOXINA

Adición	Nitrito formado (nmoles)
1 NAD(P)H	0
2 NADH, NADPRasa	0
3 NADH, Fd, NADPRasa	20,0
4 NADPH, NADPRasa	0
5 NADPH, Fd, NADPRasa	118,9

Condiciones como en la Tabla 3 , excepto enzima, par
cialmente purificado y pasado por DE-52, 45 μ g. Donde se indi
ca se añadió NADPH, 2 μ moles, en lugar de NADH. Tiempo de en-
sayo, 20 min.

de aceptar electrones de la ferredoxina reducida por distintos procedimientos (Manzano *et al.*, 1976; Manzano, 1977), pero no cuando el ditionito es el reductor de la ferredoxina (Manzano *et al.*, 1976), habiéndose observado un comportamiento similar en otra cianobacteria, *Anabaena cylindrica* (Hattori y Myers, 1967). Dado que esta misma ferredoxina reducida por ditionito es capaz de donar electrones a la nitrito reductasa (Manzano, 1977) y que la nitrato reductasa es operativa en la reducción de nitrato a altas concentraciones de ditionito cuando el transportador es el metilviológeno, puede descartarse el que un posible daño causado por el ditionito a cualquiera de estas proteínas (ferredoxina o nitrato reductasa) fuese la causa de la inoperatividad de la nitrato reductasa con el sistema ferredoxina-ditionito como donador.

Cuando se reduce la concentración de ditionito en el ensayo con ferredoxina como transportador, haciéndola 10 veces menor del valor usual (9,8 mM), se registra una apreciable producción de nitrito a partir de nitrato, lo que parece apuntar al exceso de reductor como causa de la aparente inviabilidad de la reducción enzimática de nitrato con ditionito como reductor, utilizando ferredoxina como transportador. De hecho, cuando la concentración de ditionito es relativamente baja, la ferredoxina actúa como un eficiente transportador de electrones entre el ditionito y la nitrato reductasa. La Figura 4 representa la cinética de reoxidación por nitrato, dependiente de nitrato reductasa, de ferredoxina previamente reducida por ditionito a baja concentración (49

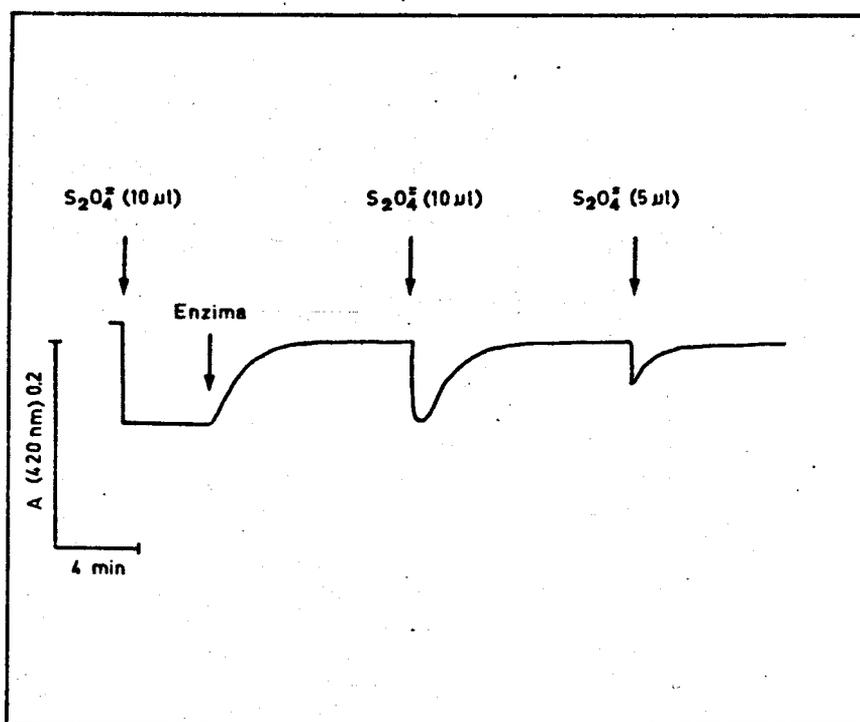


FIGURA 4. Reducción química con ditionito y reoxidación enzimática por nitrato de la ferredoxina de *A. nidulans*. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml: tampón Tris-ClH, pH 8,5, 200 μ moles; NO_3K , 40 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans*, 123 nmoles; nitrato reductasa parcialmente purificada, 32 mU; el ditionito sódico, 9,8 mM en CO_3HNa 0,3 M se añadió según se indica. Otras condiciones: anaerobiosis; temperatura, 30°C.

μM). Puede observarse que la velocidad de la reacción depende de la concentración de ferredoxina reducida, siendo idéntica en puntos equivalentes de las curvas correspondientes a distintos ciclos de reducción-oxidación. Este último hecho indica que, en las condiciones de baja concentración de ditionito empleadas, el enzima mantiene su capacidad catalítica durante periodos de tiempo relativamente largos, a diferencia de lo que ocurre en el ensayo standard con ditionito y metilviológeno (Manzano *et al.*, 1976).

III.A.4.1. *Efecto de la concentración de ditionito sobre la velocidad de la reacción catalizada por la nitrato reductasa con ferredoxina como transportador*

A fin de hallar la concentración de ditionito óptima para la reducción de nitrato, se determinó la relación existente entre velocidad de la reacción y concentración de ditionito para una cantidad fija de ferredoxina. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos para una concentración $17,6 \mu\text{M}$ de ferredoxina. En ella se observa una zona inicial en la que la cantidad de ditionito es insuficiente para reducir totalmente la ferredoxina, una zona media de concentración entre 2 y 5 veces superior a la de ferredoxina, donde la velocidad de la reacción es máxima y, por último, una tercera zona en la que la actividad disminuye proporcionalmente al logaritmo de la concentración de ditionito, hasta hacerse cero a partir de una relación molar ditionito/ferredoxina del orden de 300. En los ensayos con ditionito alto, la relación ditionito/ferredo

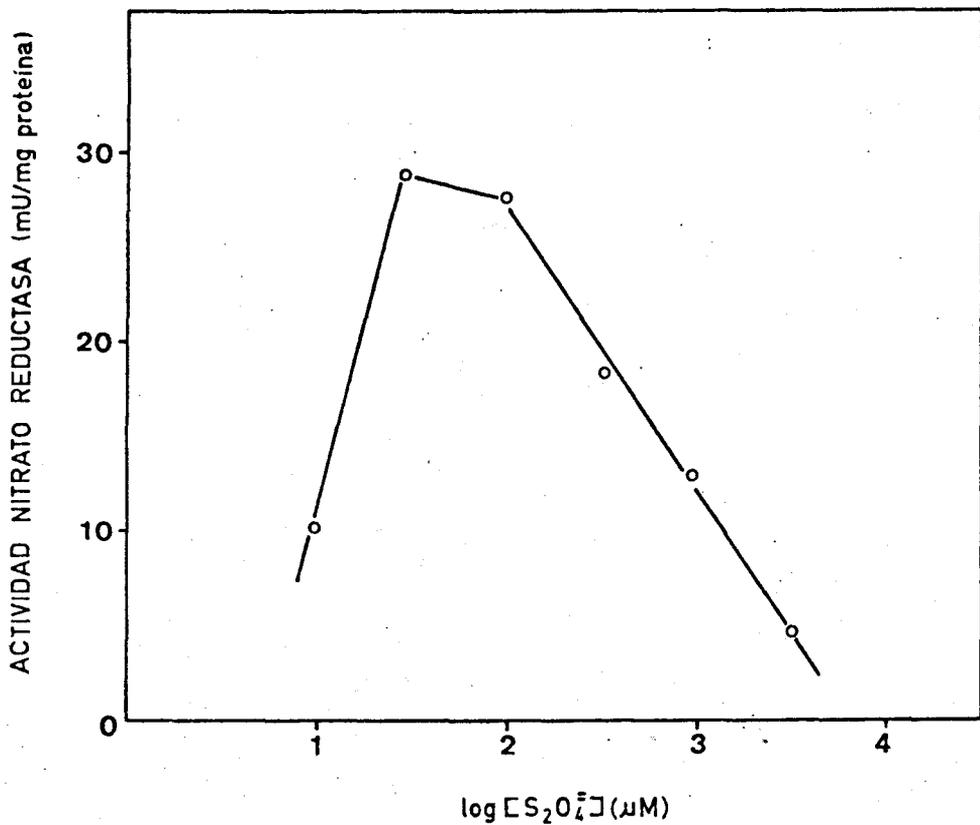


FIGURA 5. Efecto de la concentración de ditionito en la reducción del nitrato por nitrato reductasa de *A. nidulans*. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-ClH, pH 8,5, 100 μmoles; NO₃K, 20 μmoles; ferredoxina de *A. nidulans*, 17,6 nmoles; nitrato reductasa parcialmente purificada, 32 mU; y la concentración de ditionito que se indica. Otras condiciones: anaerobiosis; temperatura, 30°C; tiempo de ensayo, 5 min.

xina era de 555 , siendo esta la razón de la aparente inoperancia de la ferredoxina reducida por ditionito como donador de electrones para la nitrato reductasa de *A. nidulans*.

III.A.4.2. Eficiencia de distintos sistemas reductores de ferredoxina para la reducción de nitrato por la nitrato reductasa de *A. nidulans*

Empleando ferredoxina y ditionito en relación molar óptima, la reducción de nitrato por la nitrato reductasa alcanza valores muy superiores a los obtenidos por otros procedimientos. La Tabla V muestra que mientras los valores de velocidad de reacción conseguidos reduciendo la ferredoxina mediante sistemas fotosintéticos, fotoquímicos o enzimáticos, son del mismo orden, la reducción de ferredoxina por ditionito es cinco veces más efectiva.

III.A.4.3. Estequiometría de la reacción

Como una prueba más de la intervención de la ferredoxina en este proceso, se ha determinado la relación ferredoxina reoxidada/nitrito formado en un ensayo espectrofotométrico de reducción de nitrato con ditionito y ferredoxina. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla VI. El valor encontrado, de 2,07 se corresponde bien con el teórico de 2,0 correspondiente a la reacción:

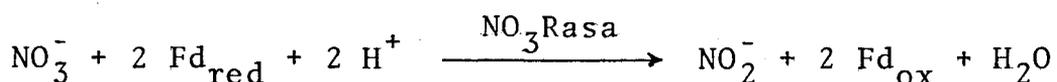


TABLA V

EFICIENCIA RELATIVA DE DISTINTOS SISTEMAS REDUCTORES DE
 FERREDOXINA EN LA REACCION CATALIZADA POR LA
 FD-NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Sistema reductor de la ferredoxina	Actividad relativa nitrato reductasa (%)
Fotosintético	100
NADPH/NADPRasa	94
Deazarriboflavina	101
Ditionito (100 μ M)	494

Las condiciones de ensayo fueron las descritas en los apartados II.B.8.4., II.B.8.3., sistema completo Tabla 7 y leyenda Fig. 4, para los ensayos fotosintéticos, con NADP/NADP reductasa, 5-deazarriboflavina iluminada y ditionito, respectivamente, excepto ferredoxina de *A. nidulans*, 60 μ M en los ensayos fotosintéticos y con ditionito. Tiempo de ensayo, 15 min, excepto en el caso del ditionito en que se calculó a partir de la velocidad inicial. El 100% de actividad corresponde a 1,3 mU. Enzima particulado conteniendo 26 μ g de clorofila.

TABLA VI

ESTEQUIOMETRIA FERREDOXINA OXIDADA/NITRITO FORMADO PARA LA
REDUCCION DE NITRATO POR LA NITRATO REDUCTASA DE
A. nidulans CON EL SISTEMA DITIONITO/FERREDOXINA
COMO REDUCTOR

Ferredoxina reoxidada	308 nmoles
Nitrito formado	149 nmoles
Ferredoxina reoxidada/nitrito formado,	2,07

Las condiciones fueron las mismas de la Figura 4.

III.A.5. La ferredoxina reducida fotoquímicamente como donador de electrones para la nitrato reductasa de *A. nidulans*

Cuando se ilumina 5-deazarriboflavina en presencia de donadores adecuados de electrones como el EDTA, este compuesto alcanza un potencial extraordinariamente negativo (-650 mV) correspondiente al par $dFl_{ox}/dFlH\cdot$, siendo capaz de reducir diferentes ferredoxinas y flavodoxinas bacterianas (Massey y Hemmerich, 1977).

La ferredoxina de *A. nidulans* también es reducida por este sistema fotoquímico como se muestra en la Figura 6A, donde se presenta la variación del espectro de absorción de una preparación de ferredoxina al ser iluminada en presencia de 5-deazarriboflavina y Tris/EDTA. Al iluminar tanto esta preparación como la referencia, idéntica pero sin ferredoxina, durante un minuto, se observa un incremento en el pico de 423 nm de la ferredoxina, con desplazamiento hacia 420 nm (espectro 1), que se hace aún más evidente después de otro minuto de iluminación (espectro 2). Si seguimos iluminando observamos una desaparición progresiva del pico de 423 así como del de 463 nm que hasta entonces se había visto poco afectado, llegando a alcanzarse un estado de reducción total (espectro 9), después de 14 min de iluminación, similar al obtenido por adición de ditionito. El fenómeno observado de incremento en absorbancia y desplazamiento del pico de 423 nm es debido según se ha comprobado, a tener sobreimpuesto el espectro de la flavina oxidada presente en la muestra. En el tubo de referen

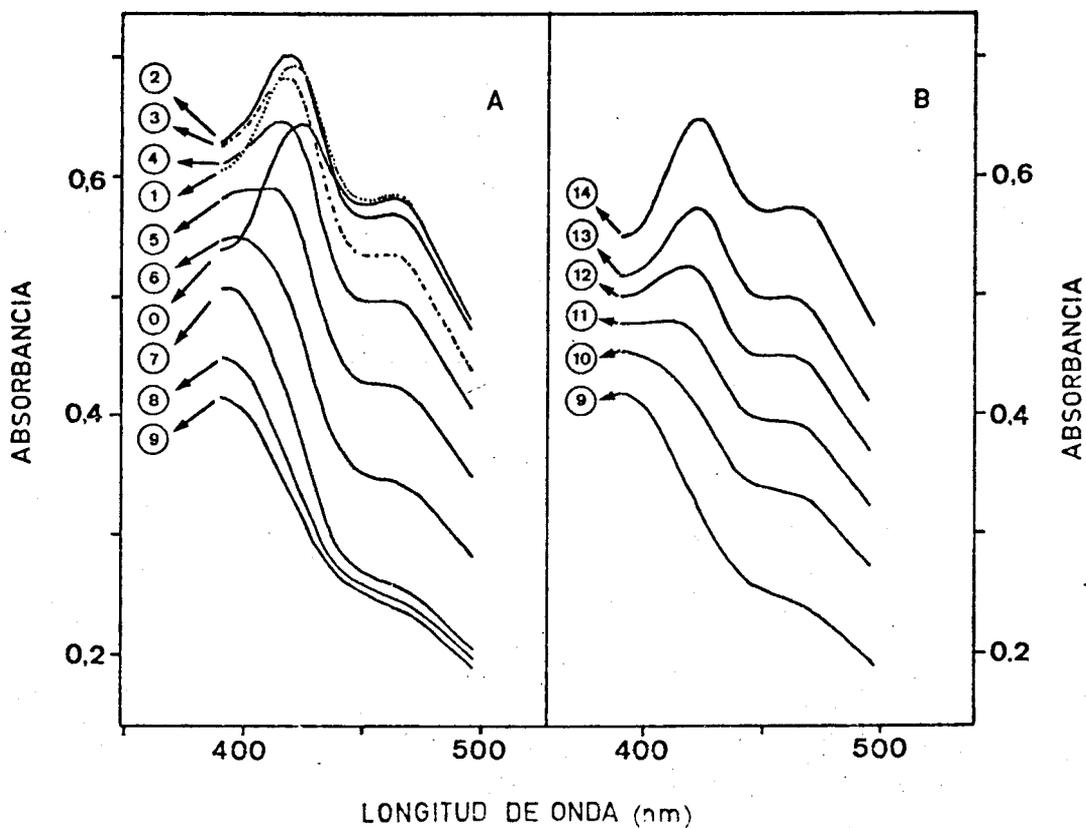


FIGURA 6. Fotorreducción con 5-deazarriboflavina iluminada (A) y reoxidación (B) de la ferredoxina de *A. nidulans*. El tubo de muestra contenía en un volumen final de 2 ml: tampón Tris-ClH, pH 8,5, 100 μ moles; EDTA·Na₂, 20 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans* 200 nmoles; 5-deazarriboflavina, 20 nmoles. El tubo de referencia era idéntico con la excepción de que no contenía ferredoxina. Otras condiciones son: anaerobiosis; temperatura, 30°C; iluminación, luz blanca 300 W/m². La reoxidación se realizó, tras el espectro 9, permitiendo la entrada lenta de aire a través de una aguja que perforaba el tapón de goma. Tiempo de iluminación entre espectros consecutivos: del 0 al 4, 1 min; del 4 al 9, 2 min. Tiempo de reoxidación entre espectros: del 9 al 13, 8 min 48 s; del 13 al 14, 44 min.

cia se anulaba la absorbancia correspondiente a la flavina oxidada al reducirse ésta por iluminación, al igual que ocurría en la muestra. Sin embargo, al cesar la iluminación, la flavina de la muestra se reoxidaba a expensas de la ferredoxina existente, lo que no podía ocurrir en la referencia donde quedaba la flavina en estado reducido. Esta es la razón que explica los espectros de absorción aparentemente anómalos obtenidos tras cortos periodos de iluminación. Cuando toda la ferredoxina de la muestra se reducía, la flavina, que no podía reoxidarse, perdía su absorbancia a 400 nm. La flavina del tubo de referencia sufría una decoloración irreversible al ser iluminada en ausencia de reductor, según se comprobó al observar que una vez reducida, la 5-deazarriboflavina no se reoxidaba en presencia de oxígeno.

La ferredoxina reducida por el procedimiento fotoquímico, podía reoxidarse fácilmente hasta su estado inicial oxidado, espectro 14, Figura 6B, y espectro 0, Figura 6A, siendo por tanto la reducción completamente reversible.

III.A.5.1. *Caracterización de la reducción de nitrato por nitrato reductasa particulada utilizando 5-deazarriboflavina iluminada*

La ferredoxina reducida por este sistema fotoquímico es capaz de donar electrones a la nitrato reductasa de *A. nidulans* para la reducción de nitrato. La Tabla VII muestra la caracterización del sistema, pudiéndose observar el reque-

TABLA VII

CARACTERIZACION DE LA REDUCCION DE NITRATO POR NITRATO REDUCTASA
 PARTICULADA DE *A. nidulans* CON 5-DEAZARRIBOFLAVINA ILUMINADA
 COMO DONADOR DE ELECTRONES

Sistema	Nitrito formado (nmoles)
Completo	39,9
<i>menos</i> 5-deazarriboflavina	1,3
<i>menos</i> ferredoxina	4,0
<i>menos</i> nitrato reductasa	0,2
<i>menos</i> nitrato	0,1
Completo oscuridad	0,0

El sistema completo contenía en un volumen final de 0,5 ml: tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25 μ moles; NO₃K, 10 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans*, 19,8 nmoles; 5-deazarriboflavina, 14 nmoles; EDTA·Na₂, 5 μ moles; enzima particulado conteniendo 26 μ g de clorofila; glucosa, 10 μ moles; catalasa, 20 μ g; y glucosa oxidasa, 15 μ g. Otras condiciones fueron, tiempo de ensayo, 30 min; temperatura, 30°C; iluminación, luz blanca 300 W/m².

rimiento de todos y cada uno de sus componentes. El hecho de que en ausencia de ferredoxina añadida la reacción tenga lugar a un 10 % de la velocidad se debe, al parecer, a la presencia de pequeñas cantidades de ferredoxina asociada a la preparación particulada.

III.A.5.2. *Efecto del pH en la reducción fotoquímica de nitrato por nitrato reductasa particulada*

Como se observa en la Figura 7, la velocidad de la reducción de nitrato por partículas de *A. nidulans*, con ferredoxina reducida fotoquímicamente, se afecta por el pH de la mezcla de ensayo. La velocidad es alta a valores de pH entre 6,3 y 7,0, se hace máxima a pH 7,5 y, a partir de este valor, disminuye marcadamente con el aumento del pH. La naturaleza del tampón no parece tener un efecto importante sobre la velocidad de la reacción.

III.A.5.3. *Efecto del pH en la reducción fotoquímica de nitrato con nitrato reductasa soluble*

Al tratar de repetir con nitrato reductasa purificada los experimentos realizados con el enzima unido a membranas, se observó que el pH óptimo hallado anteriormente no era adecuado para las nuevas condiciones de ensayo. La Tabla VIII muestra que el tampón Tris-ClH a pH 7,5, es más adecuado para la reducción fotoquímica de nitrato que el tampón fosfato del mismo pH, a diferencia de lo que ocurre con el enzima particu-

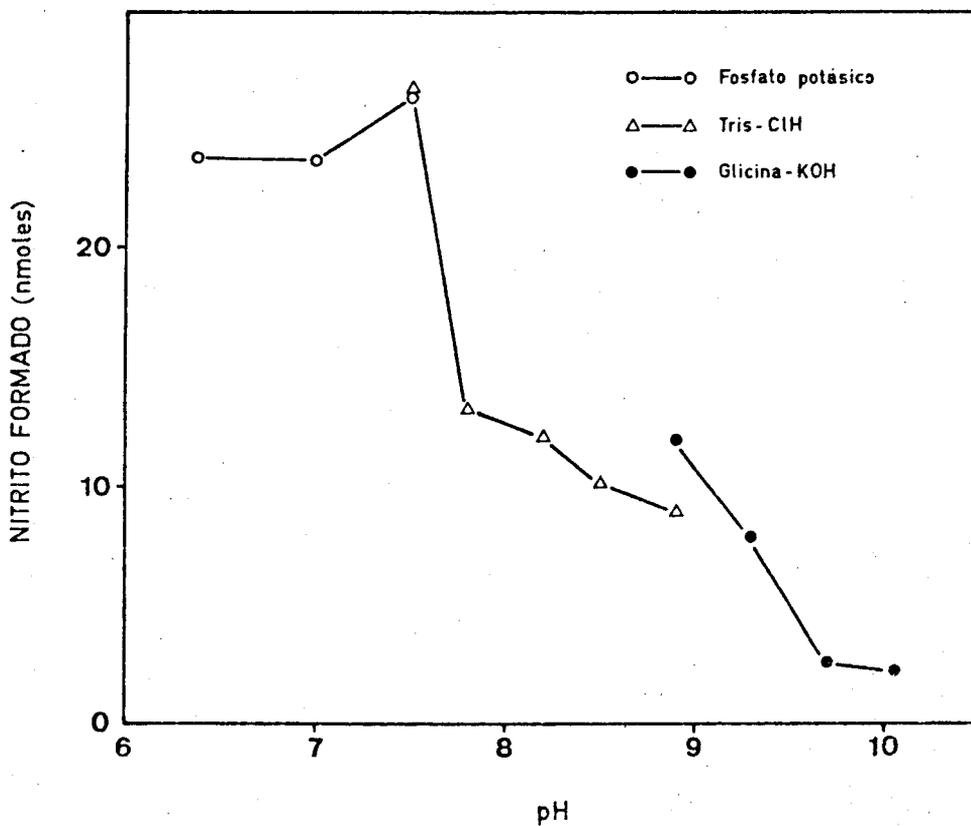


FIGURA 7. Efecto del pH en la reducción de nitrato por nitrato reductasa particulado de *A. nidulans* con 5-deazarriboflavina iluminada. Las condiciones experimentales fueron como en el sistema completo de la Tabla VII, excepto que el pH se fijó con diferentes tampones como se indica.

TABLA VIII

EFFECTIVIDAD DEL TRIS-ClH COMO SISTEMA TAMPON PARA LA REDUCCION FOTOQUIMICA DE NITRATO POR FD-NITRATO REDUCTASA SOLUBLE DE *A. nidulans* CON 5-DEAZARRIBOFLAVINA ILUMINADA COMO REDUCTOR

Sistema tampón	pH	Nitrito formado (nmoles)
Fosfato potásico	7,5	20,4
Tris-ClH	7,5	44,2
Tris-ClH	8,5	62,1

El sistema contenía en un volumen final de 0,5 ml: sistema tampón del pH indicado, 25 μ moles; NO_3K , 5 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans*, 10 nmoles; $\text{EDTA}\cdot\text{Na}_2$, 5 μ moles; 5-deazarriboflavina, 5 nmoles; y nitrato reductasa parcialmente purificada, 45 μ g. Otras condiciones son: anaerobiosis; temperatura, 30°C; tiempo de ensayo, 30 min; iluminación, 300 W/m^2 de luz blanca.

lado. Igualmente se puede observar que la velocidad de la reacción en tampón Tris-ClH de pH 8,5, es superior a la de pH 7,5 en el mismo tampón, mientras que con el enzima particulado esta última era más de dos veces superior.

III.A.5.4. *Caracterización de la reducción de nitrato dependiente de ferredoxina por nitrato reductasa soluble utilizando 5-deazarriboflavina iluminada*

Cuando se caracterizó el sistema empleando una preparación de enzima soluble, libre de ferredoxina, se obtuvieron los resultados expuestos en la Tabla IX. Puede observarse que, al igual que la luz y los demás componentes del sistema, la ferredoxina era absolutamente imprescindible para que la reacción tuviese lugar. En las condiciones del sistema completo, la cinética de reducción de nitrato era lineal durante al menos 15 min (Fig. 8), disminuyendo la velocidad progresivamente a partir de entonces y alcanzándose el máximo de producción de nitrito a los 30 min de ensayo aproximadamente, momento a partir del cual la reacción ya no progresaba más.

III.A.5.5. *Requerimiento de EDTA como donador de electrones para la 5-deazarriboflavina iluminada*

En el sistema anterior con Tris y EDTA, el requerimiento de EDTA no era apreciable ya que el propio tampón Tris puede donar electrones a la 5-deazarriboflavina iluminada (Massey y Hemmerich, 1977). Para soslayar el efecto encubridor del Tris, se repitió la caracterización anterior empleando tam

TABLA IX

CARACTERIZACION DE LA REDUCCION DE NITRATO DEPENDIENTE DE FERREDOXINA POR LA FD-NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans* CON 5-DEAZARRIBOFLAVINA ILUMINADA COMO DONADOR DE ELECTRONES

Sistema	Nitrito formado (nmoles)
Completo	65,8
<i>menos</i> 5-deazarriboflavina	0,4
<i>menos</i> ferredoxina	0,1
<i>menos</i> nitrato reductasa	0,3
<i>menos</i> nitrato	0,0
Completo, oscuridad	0,2

El sistema completo contenía en un volumen final de 0,5 ml: tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25 μ moles; NO₃K, 5 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans*, 10 nmoles; EDTA·Na₂, 5 μ moles; 5-deazarriboflavina, 5 nmoles; nitrato reductasa parcialmente purificada (eluato de DE-52 dializado), 45 μ g. Otras condiciones: anaerobiosis; temperatura, 30°C; tiempo de ensayo, 30 min; iluminación, 300 W/m² de luz blanca u oscuridad, según se indica.

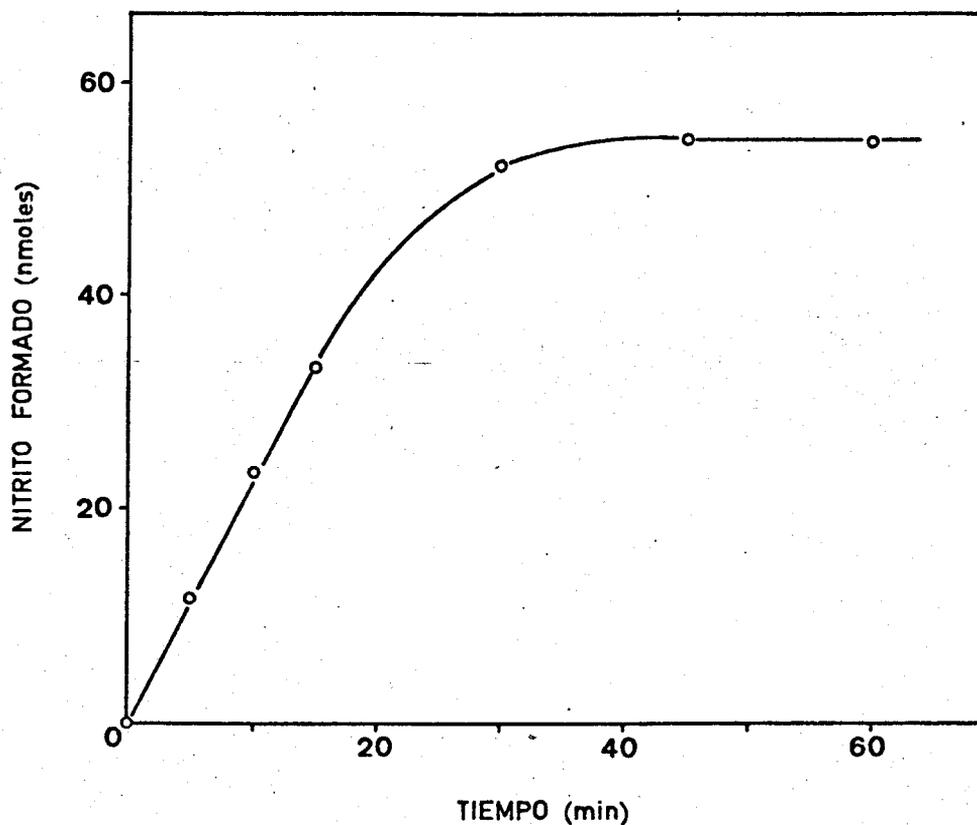


FIGURA 8. Estudio cinético de la reducción de nitrato por la nitrato reductasa soluble de *A. nidulans* con 5-deazarriboflavina iluminada. Se preparó una mezcla de reacción (4 ml volumen final) manteniendo las proporciones de los componentes del sistema completo de la Tabla IX. A los tiempos que se indica, se tomaron alícuotas en las que se analizó el nitrito. Otras condiciones como en la Tabla IX.

pón fosfato, que no puede donar electrones a la flavina iluminada.

Los resultados expuestos en la Tabla X confirman los requerimientos anteriormente observados y ponen de manifiesto la inoperancia del sistema en ausencia de EDTA como donador de electrones de la 5-deazarriboflavina.

Igualmente se observa que la inclusión de un sistema auxiliar eliminador de posibles trazas de oxígeno no sólo no favorece la reacción, sino que la inhibe en parte, probablemente debido al efecto negativo sobre la reacción de alguno de los correspondientes reactivos o productos del sistema.

III.A.5.6. *Fotorreducción de nitrato por distintas flavinas iluminadas*

La reducción de nitrato por flavinas iluminadas a través del sistema enzimático ferredoxina/nitrato reductasa no es privativo de la 5-deazarriboflavina según se deduce de los resultados presentados en la Tabla XI. Como puede observarse, tanto la riboflavina como la lumiflavina y el FMN, y en menor extensión el FAD, pueden donar electrones para la reducción de nitrato cuando se les ilumina en presencia de EDTA, si bien con menor efectividad, y necesitándose concentraciones superiores que las necesarias empleando 5-deazarriboflavina.

TABLA X

REQUERIMIENTO DE EDTA COMO DONADOR DE ELECTRONES PARA LA REDUCCION DE NITRATO CON 5-DEAZARRIBOFLAVINA ILUMINADA CATALIZADA POR LA FD-NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Sistema	Nitrito formado (nmoles)
Completo	13,9
<i>menos</i> EDTA·Na ₂	1,4
<i>menos</i> 5-deazarriboflavina	0,5
<i>menos</i> ferredoxina	0,1
<i>menos</i> nitrato reductasa	0,3
<i>menos</i> nitrato	0,0
<i>menos</i> (cat., glucosa oxidasa, glucosa)	20,6
Completo, oscuridad	0,3

El sistema completo contenía en un volumen final de 0,5 ml: tampón fosfato potásico, pH 7,5, 25 μ moles; NO₃K, 5 μ moles; ferredoxina de *A. nidulans*, 10 nmoles; EDTA·Na₂, 5 μ moles; 5-deazarriboflavina, 5 nmoles; nitrato reductasa parcialmente purificada, 45 μ g; y un sistema auxiliar eliminador de oxígeno conteniendo: glucosa, 10 μ moles; glucosa oxidasa, 15 μ g; catalasa, 20 μ g. Otras condiciones son: anaerobiosis; temperatura, 30°C; tiempo de ensayo, 30 min; iluminación, 300 W/m² de luz blanca u oscuridad, según se indica.

TABLA XI

EFFECTIVIDAD DE DISTINTAS FLAVINAS ILUMINADAS PARA LA REDUCCION FOTOQUIMICA DE NITRATO CATALIZADA POR LA FD-NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Flavina	Concentración (μ M)	Nitrito formado (nmoles)
5-Deazarriboflavina	10	62,8
Riboflavina	10	12,9
	100	16,0
Lumiflavina	10	17,0
	100	27,5
FMN	10	14,5
	100	25,5
FAD	10	5,9
	100	6,4

Las condiciones experimentales fueron como las del sistema completo, Tabla 9, excepto que la 5-deazarriboflavina fué sustituida por la flavina correspondiente, a la concentración indicada en cada caso.

III.A.5.7. *Transportadores de electrones para la reducción de nitrato por la nitrato reductasa de A. nidulans con 5-deazarriboflavina iluminada*

Los resultados expuestos en la Tabla XII demuestran que, en las condiciones empleadas, la ferredoxina es el único transportador capaz de llevar eficazmente hasta la nitrato reductasa los electrones bombeados por el sistema EDTA/5-deazarriboflavina iluminada. Ni los flavín nucleótidos ni los viológenos a la misma concentración posibilitan que se lleve a cabo la reducción de nitrato, aun cuando el metilviológeno por ejemplo, en otras condiciones, transporta eficientemente los electrones del ditionito a la nitrato reductasa.

III.B. PURIFICACION DE ENZIMAS DEPENDIENTES DE FERREDOXINA POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN GELES DE FERREDOXINA REDUCIDA-SEFAROSA

Las condiciones descritas como óptimas para la unión de nitrato reductasa a geles de Fd-Sefarosa (Ida *et al.*, 1976; Wallsgrove y Mifflin, 1977) resultaron ser completamente ineficaces en la adsorción de nitrato reductasa y NADP reductasa de *A. nidulans* a esta matriz, aún cuando ambas enzimas, al igual que la nitrato reductasa, dependen de ferredoxina como donador de electrones (Forti, 1977; Losada y Guerrero, 1979). Las modificaciones de pH, fuerza iónica y tampones tampoco consiguen mejorar la adsorción de estas proteínas al gel. Sin embargo, en presencia de ditionito ambas enzimas quedaban firmemente unidos al gel de Fd-Sefarosa, siendo esta unión estrictamen

TABLA XII

EFFECTIVIDAD DE DIFERENTES COMPUESTOS PARA LA TRANSFERENCIA
 DE ELECTRONES DESDE LA 5-DEAZARRIBOFLAVINA REDUCIDA
 FOTOQUIMICAMENTE A LA FD-NITRATO REDUCTASA
 DE *A. nidulans*

Transportador de electrones	Nitrito formado (nmoles)
Ferredoxina	61,9
Metilviológeno	0,1
Bencilviológeno	0,3
FMN	0,4
FAD	0,2

Las condiciones experimentales fueron como las del sistema completo, Tabla 9, excepto que donde se indica, se sustituyó la ferredoxina de *A. nidulans* por 10 nmoles de viológenos o flavinas.

te dependiente de la existencia de condiciones reductoras en la columna.

En la Figura 9 se observa que al pasar un extracto de *A. nidulans* preparado como se indica en Materiales y Métodos (apartado II.B.2.) a través del gel de Fd-Sefarosa, en ausencia de condiciones reductoras, tanto la NADP reductasa como la nitrato reductasa aparecen conjuntamente con el grueso de las proteínas en las primeras fracciones del eluato. Al lavar posteriormente la columna con ClNa 50 mM, se eluyen algunas proteínas adsorbidas inespecíficamente, pero que no muestran actividad nitrato reductasa o NADP reductasa. Una situación similar ocurre tras lavar la columna con ClNa 0,15 M, y ni siquiera en las fracciones resultantes de lavado con 0,5 M de ClNa se localiza actividad de estas enzimas. Los resultados indican que el gel de Fd-Sefarosa en condiciones no reductoras no es capaz de retener cantidades apreciables de nitrato reductasa o NADP reductasa de *Anacystis*.

Cuando al tampón de equilibrado de la columna se le añadía ditionito, se observaba una decoloración progresiva del gel, debido a que conforme el ditionito penetraba en la columna tenía lugar la reducción de la ferredoxina unida a la Sefarosa.

En estas condiciones (reductoras), ambas proteínas quedan retenidas por el gel. Como se observa en la Figura 10, el lavado exhaustivo con tampón de equilibrado provoca la salida de la columna de la mayor parte de las proteínas origi-

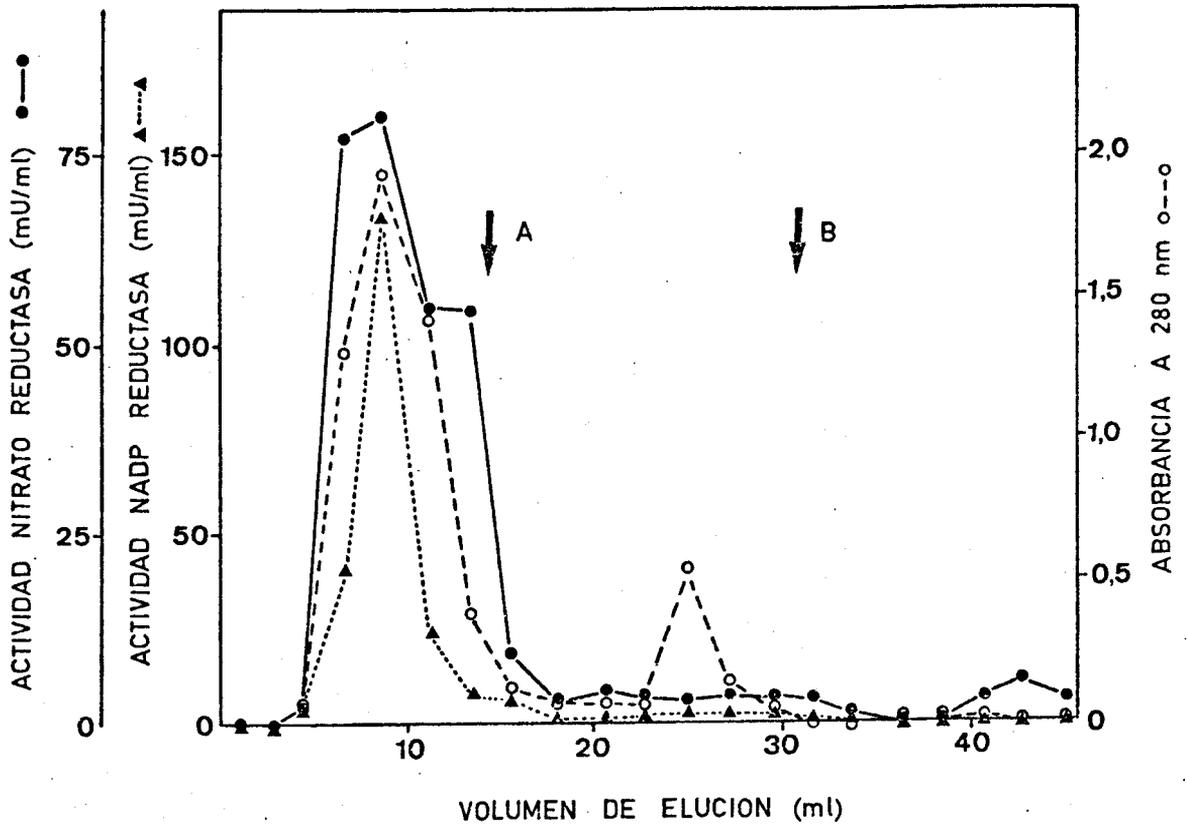


FIGURA 9. Perfil de elución de la nitrato reductasa y NADP reductasa de *A. nidulans* en un gel de ferredoxina-Sefarosa en estado oxidado. A la columna equilibrada en tampón Tris-ClH, pH 8,0, 10 mM, se aplicó una muestra de 1,0 ml de extracto preparado como se indica en el apartado II.B.2. La flecha A indica la aplicación de ClNa 50 mM en tampón de equilibrado. La flecha B indica la aplicación de ClNa 150 mM en el mismo tampón. Las actividades totales aplicadas fueron 677 y 560 mU de nitrato reductasa y NADP reductasa respectivamente. Otras condiciones como se indica en Materiales y Métodos.

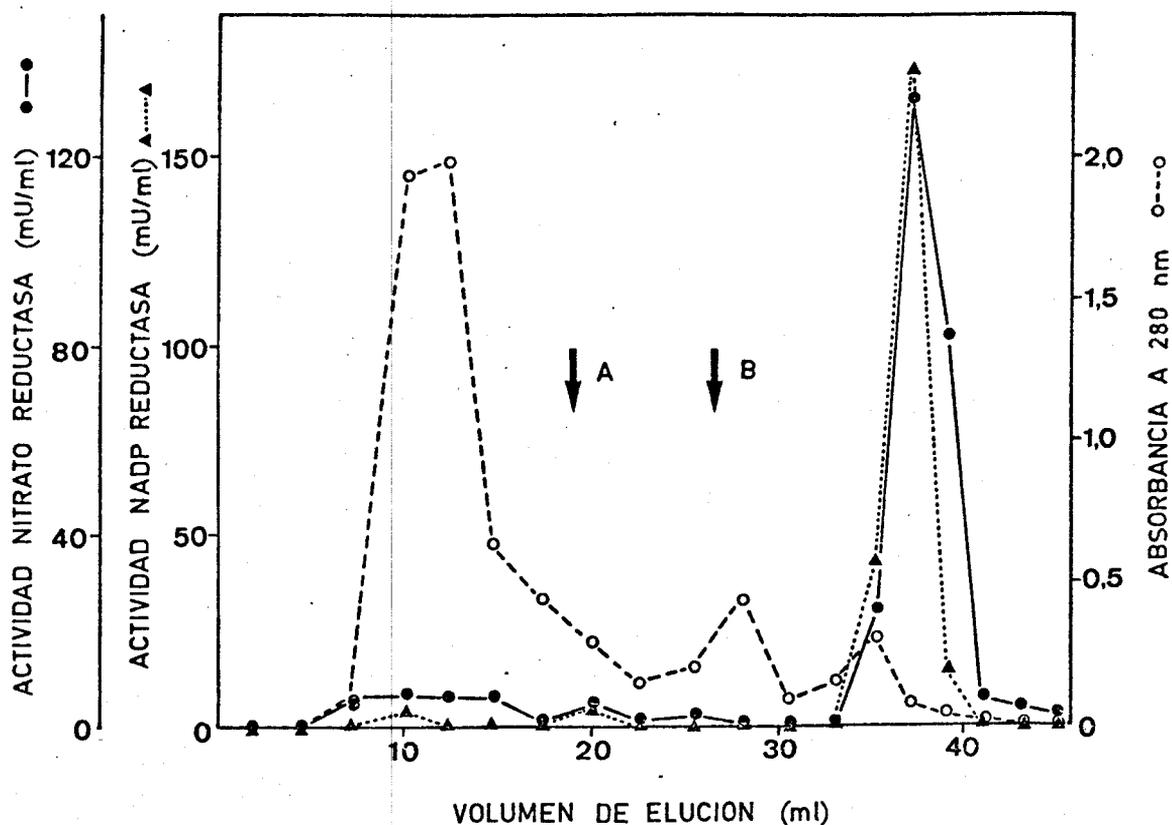


FIGURA 10. Perfil de elución de la nitrato reductasa y NADP reductasa de *A. nidulans* en un gel de ferredoxina-Sefarosa en estado reducido. Columna equilibrada en tampón Tris-ClH, pH 8,0, 10 mM suplementado con 1 mg/ml de ditionito sódico. La flecha A indica la aplicación de ClNa 50 mM en tampón de equilibrado. La flecha B indica la omisión del ditionito del tampón anterior. Otras condiciones como en la Figura 9.

nalmente presentes en el extracto, pero sin elución significativa de nitrato reductasa o NADP reductasa. Las proteínas adsorbidas inespecíficamente se eliminan lavando con ClNa 50 mM, y las dos actividades enzimáticas consideradas se eluyen simultáneamente al omitirse el ditionito del tampón de lavado y provocarse una reoxidación de la columna, que se hace patente por la recuperación del color original de la ferredoxina unida al gel.

La Tabla XIII muestra que la adsorción en condiciones reductoras, lavado y desorción por oxidación de nitrato reductasa y NADP reductasa dá lugar a una purificación de ambas proteínas de más de 80 veces, con recuperaciones cercanas al 70%.

En la Figura 11 se observa que cuando la nitrato reductasa se encuentra adsorbida al gel de Fd-Sefarosa, la aplicación de ClNa 0,15 M a la columna, flecha A, manteniendo las condiciones reductoras, provoca únicamente la elución de proteínas inespecífica o debilmente unidas al gel. La nitrato reductasa sólo se eluye al eliminar el ditionito del tampón de lavado, fecha B, demostrándose de esta forma que el factor determinante de la elución del enzima es la oxidación y no la alta fuerza iónica. Aún cuando no es esencial, la aplicación de fuerza iónica moderada favorece la desorción de la nitrato reductasa causada al reoxidar la ferredoxina unida al gel, consiguiéndose así que la proteína aparezca en picos más estrechos.

TABLA XIII

EFECTIVIDAD DE LA CROMATOGRAFIA EN GEL DE FERREDOXINA-SEFAROSA
PARA LA PURIFICACION DE ENZIMAS DEPENDIENTES DE FERREDOXINA

Enzima	Factor de purificación	Recuperación (%)
Fd-nitrato reductasa	84,7	68,0
Fd-NADP reductasa	84,2	67,6

Las condiciones de adsorción al gel y elución por oxidación fueron como en Fig. 10.

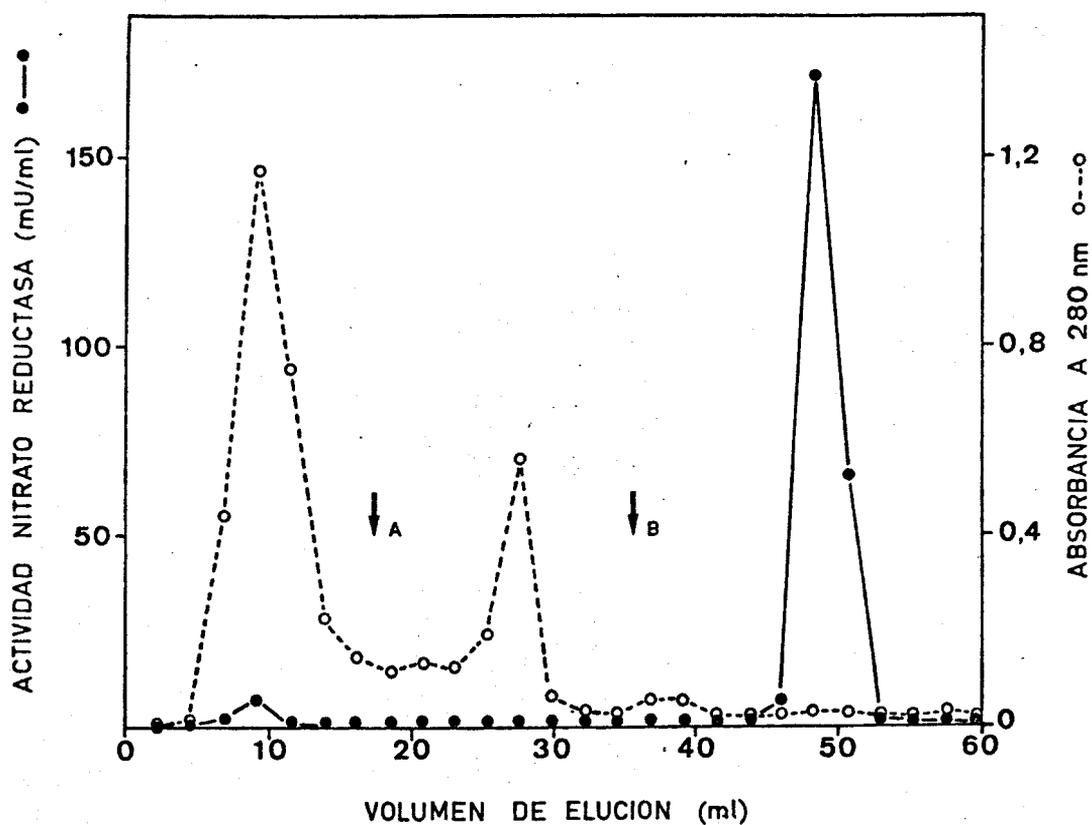


FIGURA 11. Perfil de elución de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en un gel de ferredoxina-Sefarosa en estado reducido. La flecha A indica la aplicación de ClNa 150 mM en tampón de equilibrado. La flecha B indica la omisión del ditionito del tampón anterior. Actividad nitrato reductasa aplicada, 677 mU. Otras condiciones como en la Figura 10.

La estabilidad del complejo Fd reducida/nitrato reductasa es mayor que la de los que se establecen entre el gel y otras proteínas, con cuya formación interfieren condiciones de fuerza iónica moderada. Este hecho permite simplificar el proceso de purificación (Fig. 12), eliminando el paso de lavado con ClNa 50 mM, al aplicar el extracto en unas condiciones de fuerza iónica (0,15 M de ClNa) tales que las proteínas de baja afinidad no llegan a adsorberse al gel.

La purificación y recuperación conseguidas por este procedimiento son similares a las del proceso completo. Además de simplificar las condiciones de purificación, el aplicar la muestra con ClNa 0,15 M tiene la ventaja adicional de que la preparación de nitrato reductasa así obtenida está exenta de NADP reductasa, al no llegarse a formar en estas condiciones un complejo estable Fd reducida/NADP reductasa.

El pirofosfato es un inhibidor reversible de la NADP reductasa que compite con la Fd por el sitio activo del enzima (Izawa, 1977). Por esta razón, el complejo Fd reducida/NADP reductasa puede disociarse en presencia de una cantidad adecuada de pirofosfato. La Figura 13 muestra la utilización de este compuesto para la elución selectiva de NADP reductasa de una columna de Fd-Sefarosa mantenida reducida por ditionito. La purificación conseguida de esta forma es de unas 140 veces y la recuperación del orden del 50%. Al realizarse todo el proceso en condiciones reductoras, la nitrato reductasa permanece firmemente unida al gel y, por tanto, la preparación obtenida de NADP reductasa está libre de nitrato reductasa.

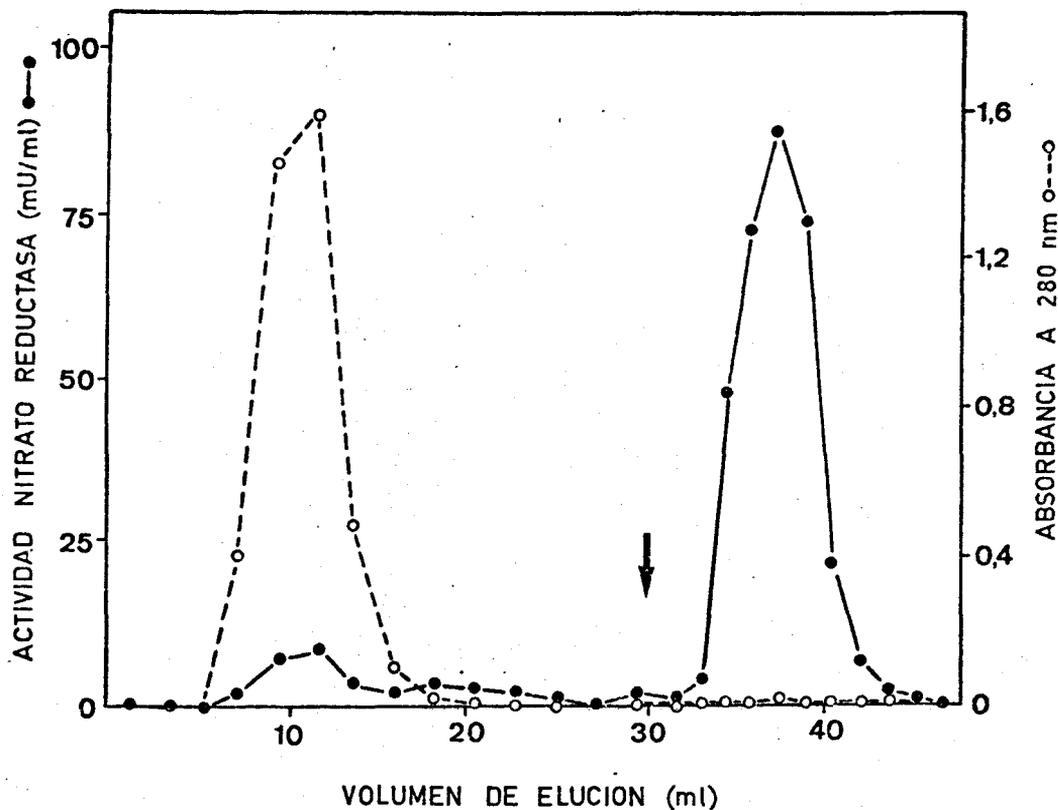


FIGURA 12. Perfil de elución de la nitrato reductasa de *A. nidulans* en un gel de ferredoxina-Sefarosa en estado reducido. La columna se equilibró en tampón Tris-ClH, pH 8,0, 10 mM, suplementado con ClNa 150 mM y 1 mg/ml de ditionito sódico. La flecha indica la omisión del ditionito del tampón de equilibrio. Actividad nitrato reductasa aplicada, 677 mU. Otras condiciones como en la Figura 9.

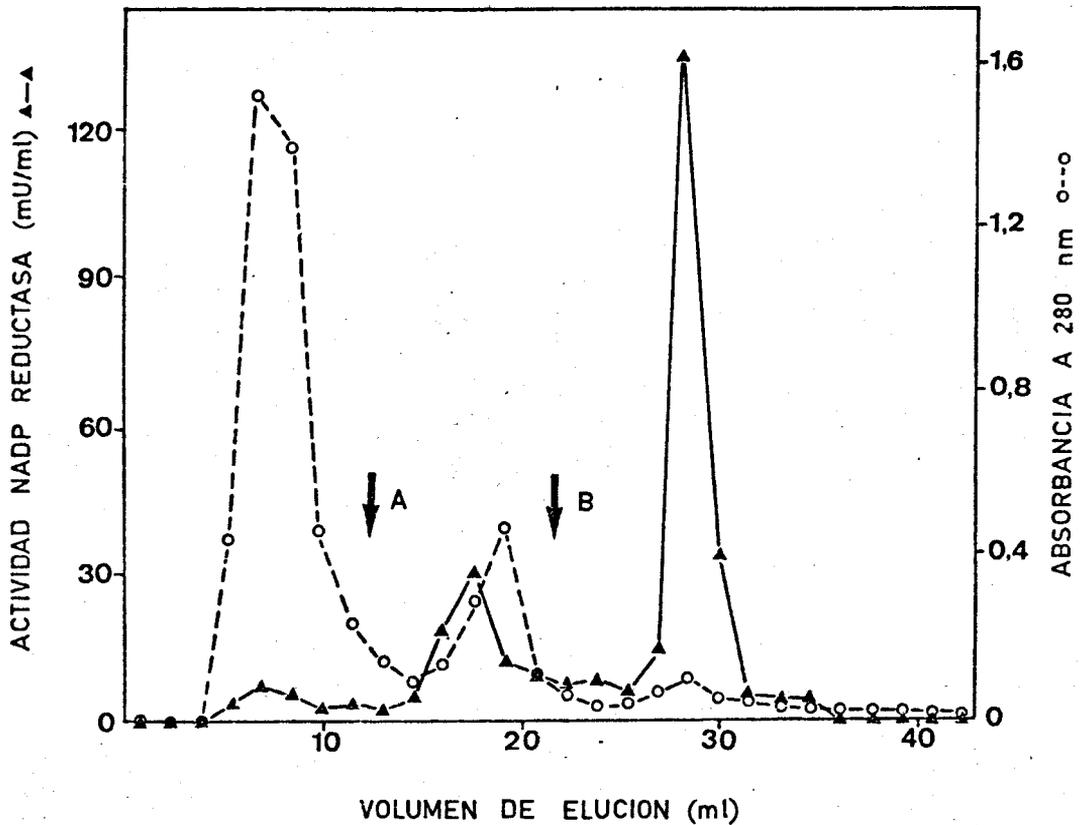


FIGURA 13. Perfil de elución de la NADP reductasa de *A. nidulans* en un gel de ferredoxina-Sefarosa en estado reducido. Columna equilibrada en tampón Tris-ClH, pH 8,0, 10 mM suplementado con 1 mg/ml de ditionito sódico. La flecha A indica la aplicación de ClNa 50 mM en tampón de equilibrado. La flecha B indica la aplicación de pirofosfato sódico 25 mM en tampón de equilibrado. Actividad NADP reductasa aplicada 560 mU. Otras condiciones como en Figura 9.

Tras eluir la NADP reductasa con pirofosfato, la nitrato reductasa puede ser eluida reoxidando el gel con un tampón sin ditionito suplementado con ClNa 0,15 M. Este procedimiento, sin embargo, no es adecuado para la purificación de la nitrato reductasa, ya que tiene lugar una importante pérdida de actividad enzimática motivada, al parecer, por la acción combinada del pirofosfato y el ditionito.

III.C. PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA FERREDOXINA-NADP REDUCTASA DE *Anacystis nidulans*

III.C.1. Purificación hasta homogeneidad de la NADP reductasa de *A. nidulans*

Para ello se utilizó un procedimiento de doble cromatografía de afinidad, empleando como primer adsorbente el gel de ferredoxina-Sefarosa y a continuación gel de azul-Sefarosa, que presenta afinidad por los enzimas dependientes de piridín nucleótidos (Thompson *et al.*, 1975).

El extracto crudo se obtenía como se indica en el apartado II.B.1. y se le aplicaban los pasos de solubilización, fraccionamiento por etanol, y cromatografía de intercambio iónico en DE-52, que se describen en detalle para la purificación de la nitrato reductasa (ver apartado II.D.1.). A continuación, el extracto se diluía con tampón T25 hasta una concentración de ClNa 50 mM y se aplicaba, una vez reducido con ditionito sódico (1 mg/ml), a una columna de gel de Fd-Sefarosa preparada con ferredoxina de *S. maxima*, de 26 mm

de diámetro por 16,5 cm de altura, previamente equilibrada en T25 suplementado con 1 mg de ditionito por ml de tampón. Una vez aplicada la muestra a la columna reducida, ésta se lavaba con T25 con ClNa 50 mM reducido por ditionito, para eliminar las proteínas debilmente unidas, y, a continuación, se eluía la NADP reductasa aplicando el mismo tampón pero suplementado con ClNa hasta una concentración 150 mM.

A la preparación diluída así obtenida se añadía sulfato amónico sólido hasta el 40% de saturación y tras 10 min de incubación en frío, se centrifugaba a $12.100 \times g$ durante 10 min. El sedimento se descartaba y al sobrenadante se le añadía nuevamente sulfato amónico hasta el 75% de saturación, repitiéndose el proceso anterior de incubación y centrifugación. El sedimento obtenido se resuspendió en un volumen mínimo de tampón Tris-ClH, pH 8,0, 10 mM, y se dializó extensivamente contra el mismo tampón (24 h, con renovación de tampón a las 12 h).

La fracción resultante de la diálisis se aplicó a una columna de azul-Sefarosa Cl-6B de 1,8 cm de diámetro por 8 cm de altura equilibrada a un flujo de 22 ml/h con el mismo tampón empleado para dializar. Las proteínas débilmente unidas al gel se eliminaron lavando con el tampón de equilibrado suplementado con ClNa a una concentración 50 mM y, a continuación, se eluyó específicamente la NADP reductasa empleando pirofosfato sódico, pH 8,25, 20 mM. El enzima presentaba aún ligeras contaminaciones de ficocianina, a juzgar por los espectros de absorción, por lo que se aplicó a una columna de DEAE-

-Sephadex A-50 de 2,5 cm de diámetro por 30 cm de altura equilibrada con Tris-ClH, pH 8,0, 100 mM. La columna se lavó consecutivamente con el mismo tampón pero de concentración creciente, 100, 130, y 200 mM (100 ml de cada uno). La banda de ficocianina empezó a moverse durante el último lavado, siendo eluída totalmente con Tris-ClH, pH 8,0, 250 mM. La banda de NADP reductasa, de color amarillo, que tras la elución de las ficocianinas ocupaba aproximadamente un tercio de la columna, fué concentrada y eluída aplicando tampón Tris-ClH, pH 8,0, 300 mM.

III.C.2. Criterios de homogeneidad

Cuando la NADP reductasa, obtenida por el sistema de purificación anteriormente descrito, se concentró con sulfato amónico al 80% de saturación y se filtró a través de una columna de Sephadex G-100 (2,5 cm de diámetro por 37 cm de altura) se obtuvo un único pico de proteína (Fig. 14). Puede observarse la coincidencia en localización y forma de la absorbancia a 275 nm, indicativa de proteína, la actividad NADP reductasa medida con ferredoxina y citocromo *c*, y la absorbancia a 456 nm característica de las flavoproteínas. La actividad específica y las relaciones A_{456}/A_{275} y A_{456}/A_{390} permanecían constantes a lo ancho del pico, con unos coeficientes de variación (s/\bar{x}) iguales al 8,1, 2,95 y 1,11% respectivamente.

Las fracciones del pico se concentraron por ultrafiltración y una alícuota del enzima concentrado se sometió a electroforesis, a pH 7,5, en gel de poliacrilamida al 7,5% de

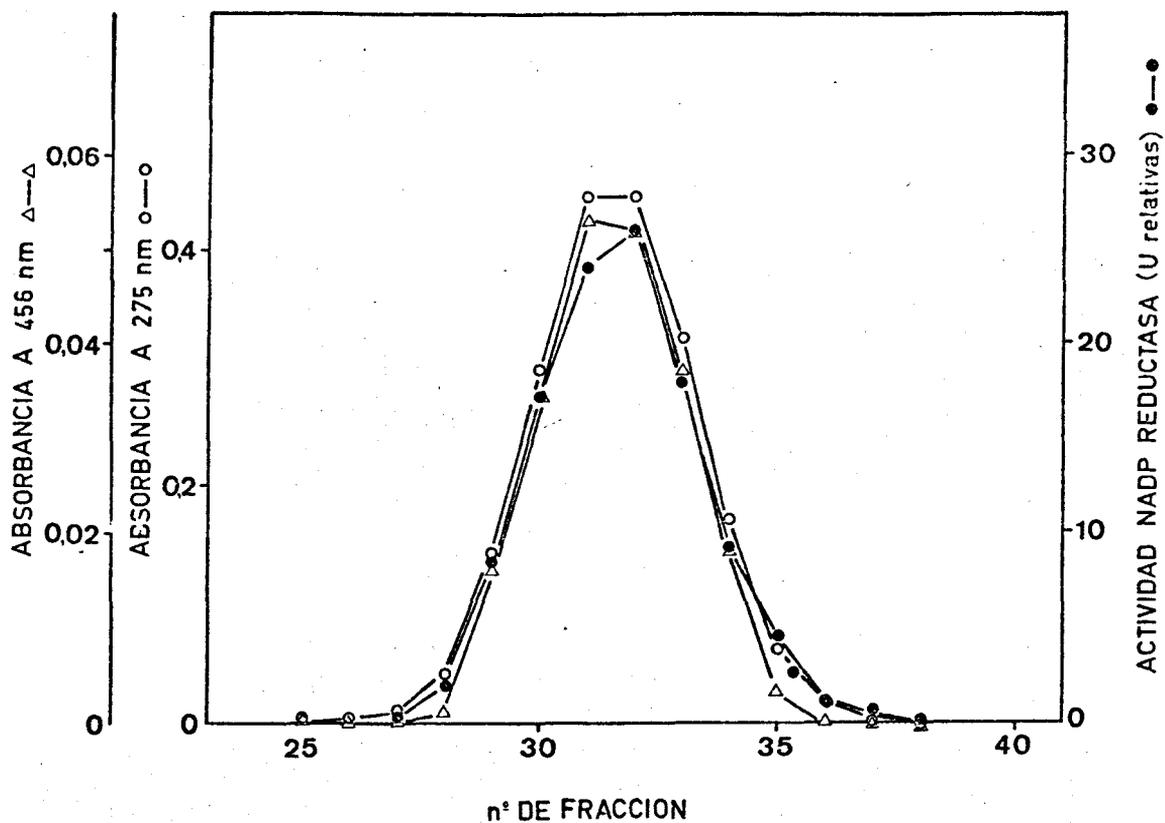


FIGURA 14. Correspondencia entre actividad NADP reductasa, absorbancia a 275 nm, y absorbancia a 456 nm, en las fracciones resultantes de cromatografía en Sephadex G-100 de una preparación purificada de NADP reductasa de *A. nidulans*. La columna estaba equilibrada en tampón Tris-ClH, pH 8,0, 25 mM. Otras condiciones experimentales se describen en el apartado II.C.2.

acrilamida según se indica en el apartado II.C.6. Los geles en que se tiñó la proteína presentaban dos bandas aproximadamente iguales, que coincidían en movilidad e intensidad relativa con los otros dos que aparecían en los geles utilizados para localizar la actividad (véase apartado II.C.10.) y que habían sido procesados simultáneamente.

Aunque el procedimiento empleado para localizar la actividad NADP reductasa no es absolutamente específico de esta enzima, el hecho de que en los geles teñidos para proteína y actividad se localizasen dos bandas de igual intensidad y posición en uno y otro, unido a la presencia de un único pico de proteína en el eluato de la filtración en gel, sugiere la existencia de dos formas de esta enzima, ambas activas, de igual tamaño molecular, pero con distinta carga eléctrica.

III.C.3. Espectro de absorción

En la Figura 15 se representa el espectro de absorción de la preparación homogénea de NADP reductasa. Pueden apreciarse picos a 275, 390 y 458 nm, hombros a 282, 290, 432, y 487 nm, y mínimos a 330 y 415 nm. La relación A_{456}/A_{390} es igual a 1,076, mientras que A_{456}/A_{275} tiene un valor de 0,136, superior al descrito por Shin (1971) para preparaciones cristalinas de NADP reductasa de espinaca, que oscilaba, según los casos, de 0,110 a 0,127.

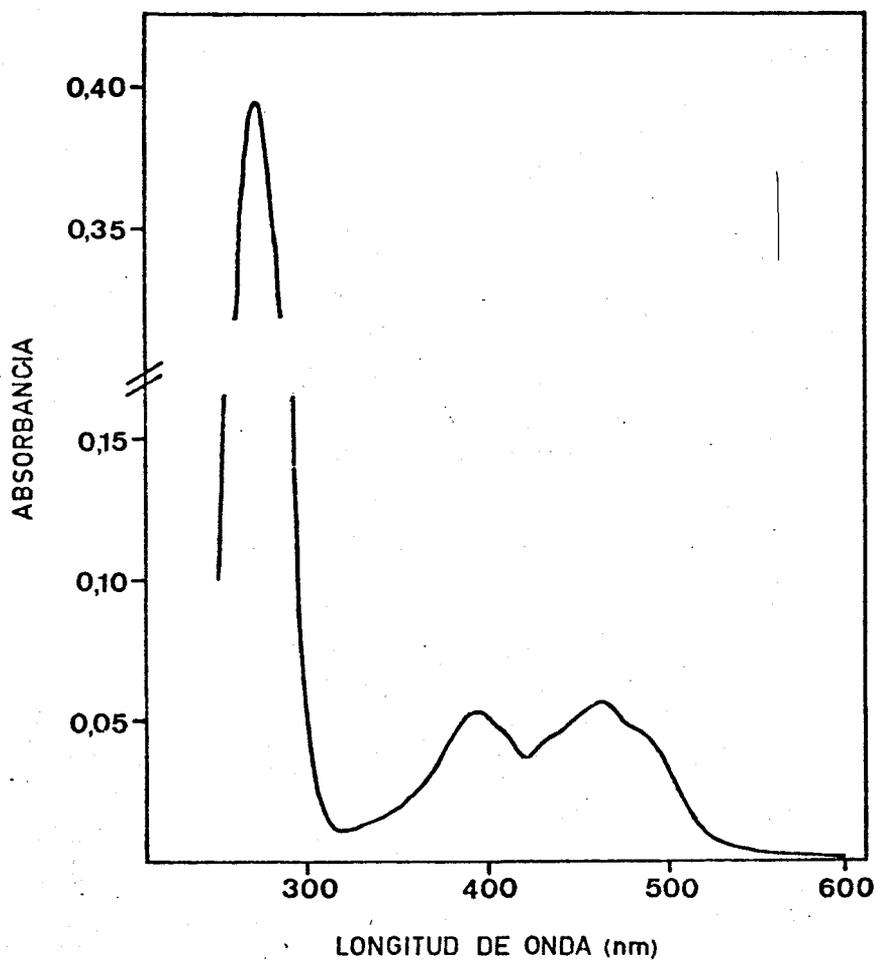


FIGURA 15. *Espectro de absorción de la NADP reductasa de A. nidulans*. La proteína se encontraba a una concentración de 0,4 mg/ml en tampón Tris-ClH, pH 8,0, 25 mM.

III.C.4. Actividades enzimáticas y especificidad por los piridín nucleótidos de la NADP reductasa de *A. nidulans*

Además de catalizar la reducción directa por NAD(P)H de DPIP, ferricianuro y sales de tetrazolio, la NADP reductasa de *A. nidulans* reduce citocromo *c* en una reacción dependiente de ferredoxina. En esta reducción puede aceptar electrones tanto de NADPH como del NADH, si bien con distinta eficacia. La Tabla XIV muestra los valores de actividad específica de cada una de las actividades, determinadas con NADPH y NADH como donadores de electrones. La velocidad de reducción de citocromo *c* mediada por la ferredoxina con NADPH es del orden de 150 veces superior a la observada empleando NADH como reductor.

Las actividades transhidrogenasas tanto con NADPH como con NADH se ensayaron empleando análogos de las formas oxidadas de los piridín nucleótidos, que presentan un máximo de absorción a 363 nm en lugar de 340 nm. El hecho de conocer los coeficientes de extinción de los piridín nucleótidos y de sus análogos a 340 y 363 nm permitió estudiar la transferencia de electrones desde NADPH a 3-acetilpiridina NAD⁺ y desde NADH a 3-acetilpiridina NADP⁺.

III.D. PURIFICACION HASTA HOMOGENEIDAD DE LA FERREDOXINA-NITRATO REDUCTASA DE *Anacystis nidulans*

III.D.1. Purificación de la nitrato reductasa de *A. nidulans*

La purificación que se describe a continuación corresponde a un caso particular de entre las realizadas a lo largo

TABLA XIV

NADPH Y NADH COMO DONADORES DE ELECTRONES PARA DISTINTAS
ACTIVIDADES ENZIMATICAS DE LA NADP REDUCTASA DE *A. nidulans*

Actividad	Actividad específica (mU/mg proteína)	
	<u>con NADPH</u>	<u>con NADH</u>
Citocromo <i>c</i> reductasa	30.600	205
Oxidasa	46,2	N.D.
Transhidrogenasa	4,51	N.D.

Las condiciones de ensayo con citocromo *c* como aceptor son las descritas en el apartado II.B.9. Para la determinación de las actividades oxidasas se utilizó una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-ClH, pH 7,5, 17,5 μ moles; NADPH ó NADH, 125 nmoles; y una cantidad adecuada de enzima. Para el ensayo de las actividades transhidrogenasas, la mezcla de reacción contenía además, 3-acetilpiridina NAD⁺ (para el caso de NADPH como donador) ó 3-acetilpiridina NADP⁺ (para el caso de NADH). N.D.: no detectado.

de este trabajo. Sus resultados, aún cuando se registran ligeras diferencias de una purificación a otra, pueden considerarse representativos ya que, en general, las variaciones suelen ser del orden del 10% o inferiores.

El tampón utilizado a lo largo de toda la purificación, Tris-ClH 25 mM, pH 8,5, EDTA 0,5 mM, se denominará abreviadamente T25.

La elección de Tris-ClH a pH 8,5 está basada en la mayor estabilidad que presenta el enzima en este tampón frente a otros tampones y valores de pH. La concentración del tampón es baja a fin de evitar posibles interferencias en los ensayos y en los procesos de intercambio iónico. Por último, la inclusión de EDTA se justifica por su efecto estabilizante sobre la actividad del enzima, lo que probablemente se debe a su capacidad quelante de metales pesados.

Todas las operaciones se llevaron a cabo a temperaturas comprendidas entre 0 y 4°C.

III.D.1.1. *Solubilización de la nitrato reductasa*

Un alto porcentaje de la actividad nitrato reductasa presente en el extracto crudo preparado como se indica en el apartado II.B.1., se encuentra asociado a fragmentos de membrana no sedimentables por centrifugación a 3.300 x g. A fin de solubilizar el enzima, se añadía al extracto la cantidad adecuada de nitrato sódico sólido para obtener una concentración final de 1 M. La adición se realizaba lentamente disolviendo

el nitrato por agitación suave a medida que se iba añadiendo. Una vez disuelto el nitrato, el extracto se mantenía durante dos horas con agitación ocasional y posteriormente se centrifugaba a $104.000 \times g$ durante 90 min.

El sedimento se descartaba, ya que el enzima permanecía en la fracción sobrenadante. Este sobrenadante (175 ml) presentaba un color verde-azulado, siendo bastante más fluido que el extracto original.

En la Tabla XV puede observarse que aproximadamente el 75% de la actividad se recuperaba en el sobrenadante, con un factor de purificación de 1,4. La aparentemente baja purificación conseguida, a pesar de la considerable cantidad de material que sedimenta, se explica porque la mayor parte del material precipitado es de tipo no proteico (lípidos, etc.).

El nitrato parece actuar en la solubilización del enzima a través de un efecto caotrópico. La utilización de otros agentes, tales como cloruro sódico, sulfocianuro potásico o perclorato potásico, no mejoró el rendimiento del paso, ya que mientras unos, como el ClNa , no solubilizaban suficientemente al enzima, otros como el SCNK y ClO_4K provocaban pérdida de la actividad nitrato reductasa.

III.D.1.2. *Precipitación fraccionada con etanol del 50 al 70% (v/v)*

El sobrenadante resultante del paso anterior se sometía inmediatamente a fraccionamiento con etanol, ya que si el

TABLA XV

RECUPERACION, PURIFICACION Y RELACION DE ACTIVIDADES CON MV Y FD DE LAS DISTINTAS ETAPAS DE LA PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Etapa	Recuperación ^a (%)	Factor de purificación	$\frac{\text{Act. MV-NO}_3\text{Rasa}^b}{\text{Act. Fd-NO}_3\text{Rasa}}$
Obtención del extracto crudo	-	-	17,2
Solubilización del enzima	75,6	1,4	22,4
Precipitación con etanol (50-70%)	77,1	28,4	22,4
Cromatografía en DE-52	85,8	3,0	<i>c</i>
Cromatografía de afinidad en Fd-Sefarosa	61,2 ^d 72,5	57,8	22,8
Filtración en Aca 44 y concentración	82,4	1,5	<i>c</i>

a: Referida a la actividad inicial de cada etapa

b: Determinada en la fracción obtenida tras la etapa correspondiente

c: No determinada

d: Vease la descripción de la etapa en el texto

tratamiento con nitrato se prolongaba, se registraba una pérdida gradual de actividad, que llegaba a ser del 40-50% en 12 h.

Al extracto se le añadía lentamente y con agitación continua un volumen igual de etanol absoluto preenfriado a -15°C , y se incubaba en hielo durante 10 min con agitación ocasional. La última parte del tratamiento se realizaba en tubos de centrífuga, a fin de que estuviesen dispuestos para centrifugar a los 10 min exactos de la adición del etanol.

Se centrifugaba a $7.900 \times g$ durante 15 min obteniéndose un sobrenadante azul y un precipitado de color verde que se descartaba.

Al sobrenadante (unos 320 ml) se le añadía nuevamente etanol, en las condiciones anteriores, hasta alcanzar el 70% (v/v). A esta concentración se observaba pérdida de la fluorescencia típica de la ficocianina y aparición de grumos de color azul. Tras 10 min de incubación, se centrifugaba a $7.900 \times g$ durante 25 min y se descartaba el sobrenadante que contenía la mayor parte de las ficocianinas.

El sedimento se resuspendía cuidadosamente en T25 suplementado con $\text{ClNa } 0,15 \text{ M}$, hasta un volumen final de 25 ml y se dializaba contra 2 l de este mismo tampón durante 12 h.

Tras la diálisis, el tubo presentaba un precipitado azul de 1/3 a 1/6 de su longitud, constituido fundamentalmente por ficocianinas desnaturalizadas. Se transfería el dializado

a un tubo de centrifuga, lavando la tripa con 5 ml de T25, y se centrifugaba a 43.500 x g durante 20 min. El sobrenadante, producto final del paso, consistía en unos 38 ml de un líquido claro de color grisáceo-azulado.

La Tabla XV muestra que la recuperación de este paso era del orden del 77% con una purificación de más de 28 veces. Cuando se utilizaron otros compuestos que, al igual que el etanol, actúan disminuyendo la constante dieléctrica del medio, tales como butanol o acetona, a distintos pH y temperaturas, se produjo una pérdida irreversible de la actividad nitrato reductasa.

III.D.1.3. *Cromatografía en DEAE-celulosa*

La preparación resultante del fraccionamiento con etanol contenía cantidades importantes de ferredoxina que podría competir ventajosamente con la unida a la sefarosa utilizada en el siguiente paso de purificación, en la formación del complejo Fd-nitrato reductasa.

Con el principal objeto de eliminar la ferredoxina libre, y teniendo en cuenta el caracter fuertemente ácido de esta proteína, se utilizó un lecho de DEAE-celulosa (30 mm x 70 mm) formada a partir de 30 g de peso seco del adsorbente (DE-52) equilibrado con T25, montado en una columna de vidrio y sometido a un flujo de 180 ml/h.

La muestra (38 ml) se diluyó al doble con T25 a fin de disminuir la concentración de ClNa y favorecer las interac-

ciones de las proteínas con la DEAE-celulosa. Tras aplicar la muestra, se lavaba la columna primero con 50 ml de T25, y posteriormente con 150 ml de T25 suplementado con ClNa 0,12 M. Al observarse la aparición de ficocianinas en el eluato de la columna, se empezaba a recoger fracciones de 6 ml. El enzima se eluía al incrementar la concentración de ClNa en T25 hasta 0,25 M, y formaba parte de una banda de color marrón (exenta de ferredoxina) en la que también se detectaba actividad NADP reductasa. La actividad nitrato reductasa localizada en las fracciones 21 a 35, suponía un 86% de la aplicada, con una purificación de 3 veces (Tabla XV).

La ferredoxina quedaba retenida en la parte superior de la columna y se eluía con ClNa 0,35 M en T25 para su posterior aprovechamiento. La cantidad de ferredoxina recuperada de la columna por este procedimiento era del orden de 36 a 40 mg.

III.D.1.4. *Cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa*

El gel de Fd-sefarosa utilizado se preparó uniendo ferredoxina de *S. maxima* a Sefarosa 4B por el procedimiento indicado en el apartado II.B.7. Se empleó una columna de 26 mm de diámetro por 16,5 cm de altura, empaquetándose el lecho del gel a un flujo de 103 ml/h empleando T25 suplementado con ClNa 0,15 M como tampón de equilibrado. La ferredoxina unida a la Sefarosa se redujo con 90 ml del mismo tampón al que se había agregado ditionito sódico para alcanzar una concentración de 1 mg de ditionito por ml de tampón.

Cuando la columna estuvo completamente reducida -gel decolorado- se empezó a aplicar la muestra, previamente reducida por ditionito a la misma concentración que en el tampón. Esta muestra consistía en la mitad del volumen del eluato de DEAE-celulosa (aproximadamente 50 ml), diluido con T25 hasta conseguir una concentración de ClNa de 0,15 M. La razón de aplicar solo el 50% del eluato de DEAE-celulosa, era el evitar sobrepasar la capacidad de la columna, aproximadamente 150 unidades, por lo que el proceso debía repetirse por dos veces.

Tras aplicar la muestra, se lavó con 90 ml (aproximadamente un volumen de columna) del tampón de equilibrado, a fin de eliminar las proteínas débilmente unidas al gel, y finalmente se reoxidó la ferredoxina del gel al lavar la columna con T25 + ClNa 0,15 M, suplementado con NO_3Na 50 mM.

Dado que el frente de oxidación era claramente visible debido a su color, se empezaba a recoger fracciones (5 ml) cuando éste se aproximaba a la salida de la columna.

La Tabla XV muestra que en estas condiciones la recuperación era del 61,2% de la actividad original, siendo la purificación de 57,8 veces.

De las 442 unidades aplicadas, el 17,2% (38,6 U y 39,2 U en la primera y segunda tanda respectivamente) no se unieron a la columna y fueron recuperadas, utilizándose, después de dializar contra T25 + ClNa 0,15 M, como material de partida para otra aplicación a la columna de Fd-Sefarosa. Las unidades obtenidas en esta última fase constituyen un 11,3% de

las 442 aplicadas originalmente, con lo que la recuperación real del paso sube al 72,5%, si bien esto se ha contabilizado en los resultados de la Tabla XVI al no haberse incorporado al material que se sometía a posterior purificación. Los eluatos de la cromatografía en columna de Fd-Sefarosa se unieron y el conjunto se concentró por ultrafiltración, según se describe en el apartado II.C.22.

Una alícuota del concentrado se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida y, tras teñir las proteínas del gel, se obtuvo el densitograma mostrado en la Figura 16. Puede observarse la presencia de tres picos correspondientes a otras tantas bandas de proteína visibles en el gel después de su tinción. Las superficies respectivas, proporcionales a las cantidades de proteína teñida, indicaban que el pico central contenía el 67,3% de la proteína total aplicada. La actividad nitrato reductasa coincidía con este pico central según se comprobó en geles paralelos sometidos a electroforesis simultáneamente, como se indica en Materiales y Métodos.

III.D.1.5. *Cromatografía de filtración en gel*

A fin de eliminar las proteínas contaminantes presentes tras el paso de cromatografía de afinidad, la preparación concentrada resultante de esa etapa se sometió a filtración en gel de AcA 44 (rango de fraccionamiento de 12.000 a 130.000 D).

Típicamente esta filtración se realizaba con el conjunto de material correspondiente a tres purificaciones, ya

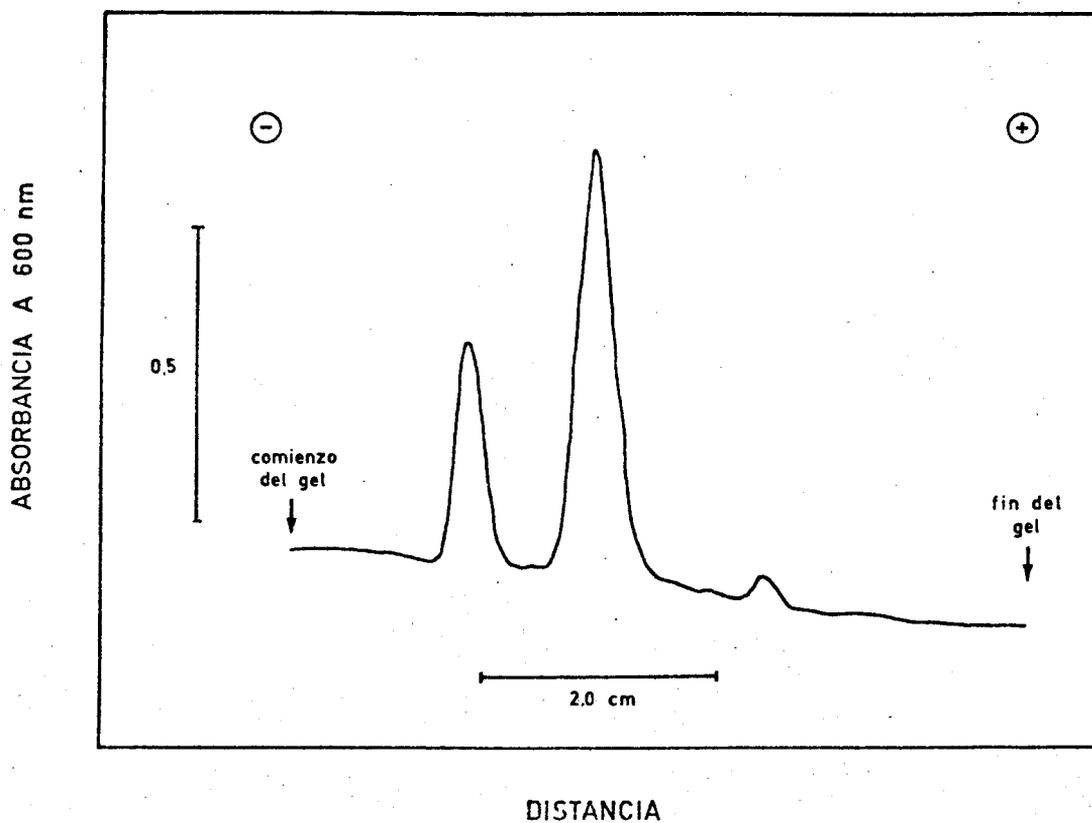


FIGURA 16. Desintograma correspondiente a la electroforesis en gel de poliacrilamida del eluato concentrado de ferredoxina-Sefarosa. Tinción de proteína. Volumen de muestra 30 μ l. Otras condiciones como se indica en Materiales y Métodos.

que, de esta forma, la recuperación global era mayor que cuando se utilizaban cantidades más reducidas.

La columna empleada (25 mm x 95 cm) se equilibró con Tris-ClH 50 mM, pH 8,5, EDTA 0,5 mM (T50) a un flujo de 27 ml/h. Se utilizó un tampón más concentrado que el habitual (T50 en lugar de T25) para minimizar las interacciones de las proteínas con el gel. La aplicación de la muestra y el desarrollo de la columna se llevó a cabo como se indica en Materiales y Métodos.

Tras eliminar los 194 ml iniciales (volumen vacío de la columna), se empezó a recoger fracciones de 2,7 ml, localizándose la actividad nitrato reductasa en las fracciones 20-33, que se unieron y se concentraron por ultrafiltración.

En la Tabla XV se muestra que la recuperación calculada a partir de los ensayos de actividad fue del 82,4%, en buena coincidencia con el 83,8% calculado a partir de las áreas de los picos de los densitogramas (Figs. 16 y 17). La purificación conseguida en este último paso fue de 1,5 veces.

La Tabla XVI resume los resultados obtenidos en la purificación anteriormente descrita. (Los valores para el paso de filtración en gel corresponden a los obtenidos en el paso común, aplicados a esta purificación en particular).

Puede observarse que a partir de 88 g (peso fresco) de células de *A. nidulans* se obtuvieron 0,26 mg de enzima con una purificación de más de 10.000 veces y una recuperación su

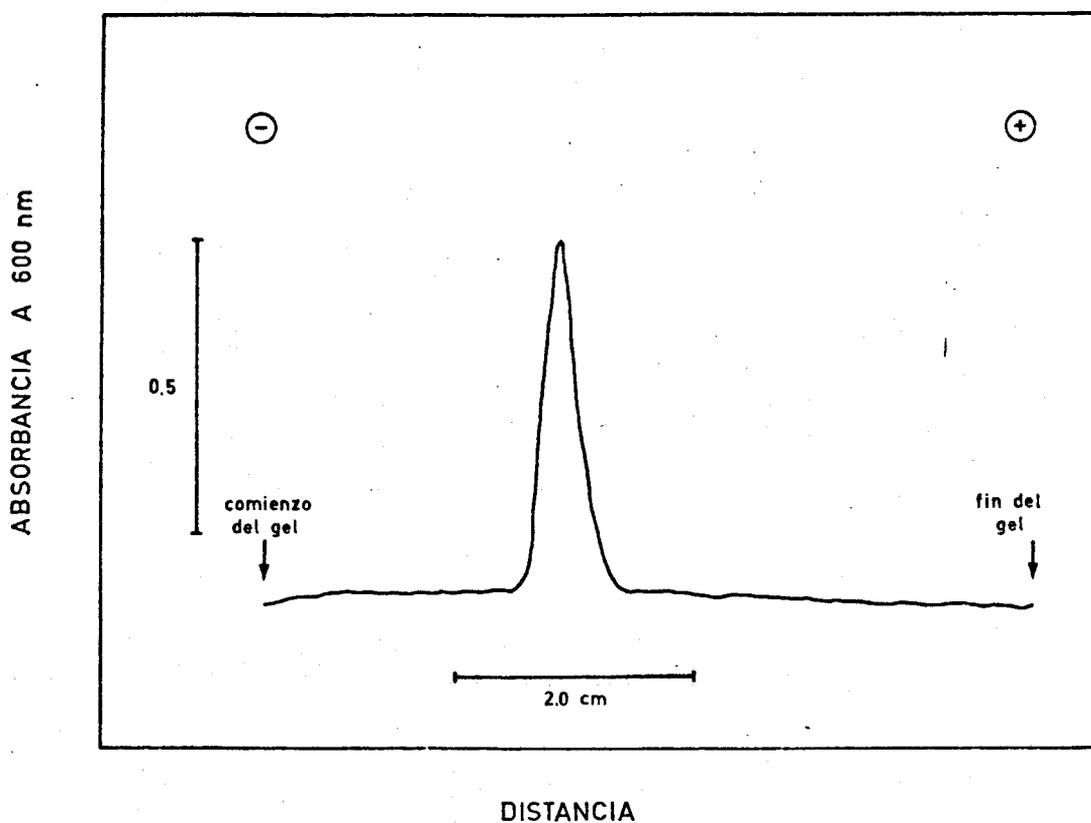


FIGURA 17. Densitograma correspondiente a la electroforesis en gel de poliacrilamida del eluato concentrado de ultragel AcA 44. Tinción de proteína. Volumen de muestra 30 μ l. Otras condiciones como se indica en Materiales y Métodos.

TABLA XVI

RESUMEN DE LA PURIFICACION HASTA HOMOGENEIDAD DE LA FD-NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Recuperación (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	195	883,9	10.126,4	0,087	100,0	1,0
Enzima solubilizado	175	668,2	5.596,5	0,120	75,6	1,4
Precipitado de etanol (50-70%)	38	515,4	151,7	3,40	58,3	39,0
Eluato cromatogra- fía en DE-52	95	442,2	43,4	10,19	50,0	116,7
Eluato cromatogra- fía afinidad en Fd-Sefarosa	60	270,8	0,46	588,70	30,6	6.743,2
Eluato concentrado de filtración en ACA 44	1,15	227,4	0,26	874,80	25,6	10.020,4

Los detalles de la purificación se describen en el texto.

perior al 25%. La actividad específica nitrato reductasa en la fracción final era de 874,8 U/mg.

Aunque los valores reflejados en las Tablas XV y XVI están calculados en base a las actividades MV-nitrato reductasa, los valores con Fd reducida enzimáticamente como donador de electrones guardan una relación similar, ya que la razón entre ambas actividades se mantiene constante a lo largo de la purificación (Tabla XV).

III.D.2. Criterios de homogeneidad

III.D.2.1. *Constancia de actividad específica*

La Figura 18 representa la actividad nitrato reductasa y la cantidad de proteína presente en las fracciones resultantes de la filtración en gel de Aca 44, último paso de la purificación.

La coincidencia en forma y localización de ambos picos indica la estrecha correlación existente entre actividad nitrato reductasa y cantidad de proteína, lo que sugiere la presencia de una única proteína en las fracciones del pico donde la actividad específica presenta valores prácticamente idénticos. Las fracciones centrales del mismo (23-28) que engloban el 71% de la actividad total, tienen una actividad específica media de 863,7 U/mg con una desviación típica de 27,0, equivalente a sólo el 3,1% de la media.

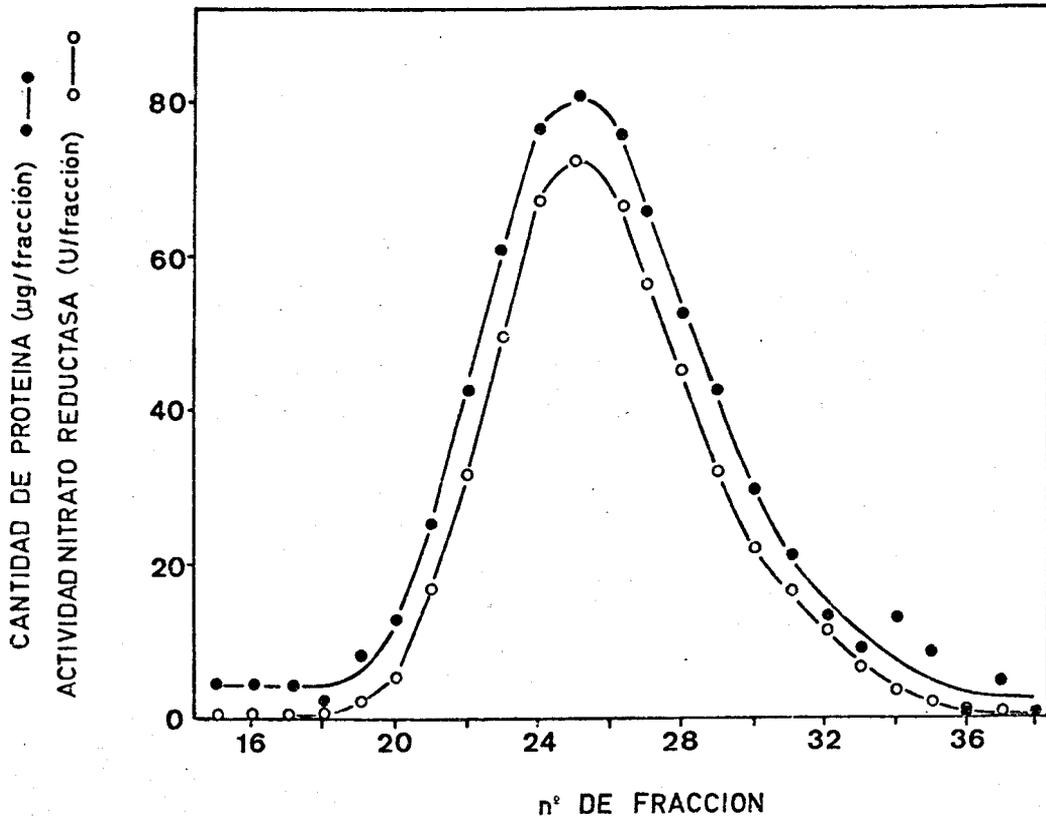


FIGURA 18. Correspondencia entre actividad nitrato reductasa y cantidad de proteína en las fracciones resultantes de cromatografía en ultragel AcA 44 de una preparación purificada de nitrato reductasa de *A. nidulans*. Las condiciones experimentales se describen en el apartado III.D.1.5.

III.D.2.2. *Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida*

El eluato de la filtración en gel, una vez concentrado, se sometió a electroforesis analítica en geles de poliacrilamida según se indica en Materiales y Métodos.

El densitograma representado en la Figura 17 corresponde a la electroforesis a pH 7,5 de una muestra de 30 μ l (7 μ g de proteína) de la preparación concentrada, en gel de poliacrilamida al 7,5%. En él se observa la presencia de un único pico que por tinción de actividad enzimática se comprobó que correspondía a nitrato reductasa. Se obtuvieron resultados análogos cuando la electroforesis se llevó a cabo a pH 9,5, por lo que puede afirmarse que dentro de los valores de resolución del método (2-3%), la proteína obtenida se encuentra en estado homogéneo.

III.E. PROPIEDADES DE LA FERREDOXINA-NITRATO REDUCTASA DE *Anacystis nidulans*

III.E.1. Propiedades moleculares de la nitrato reductasa

III.E.1.1. *Coefficiente de sedimentación de la nitrato reductasa*

Una alícuota de nitrato reductasa homogénea (0,3 U) se sometió a centrifugación en gradiente de sacarosa (5-20%) como se indica en el apartado II.C.2. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 19. Los valores correspondientes a los marcadores se ajustan a una recta de ecuación:

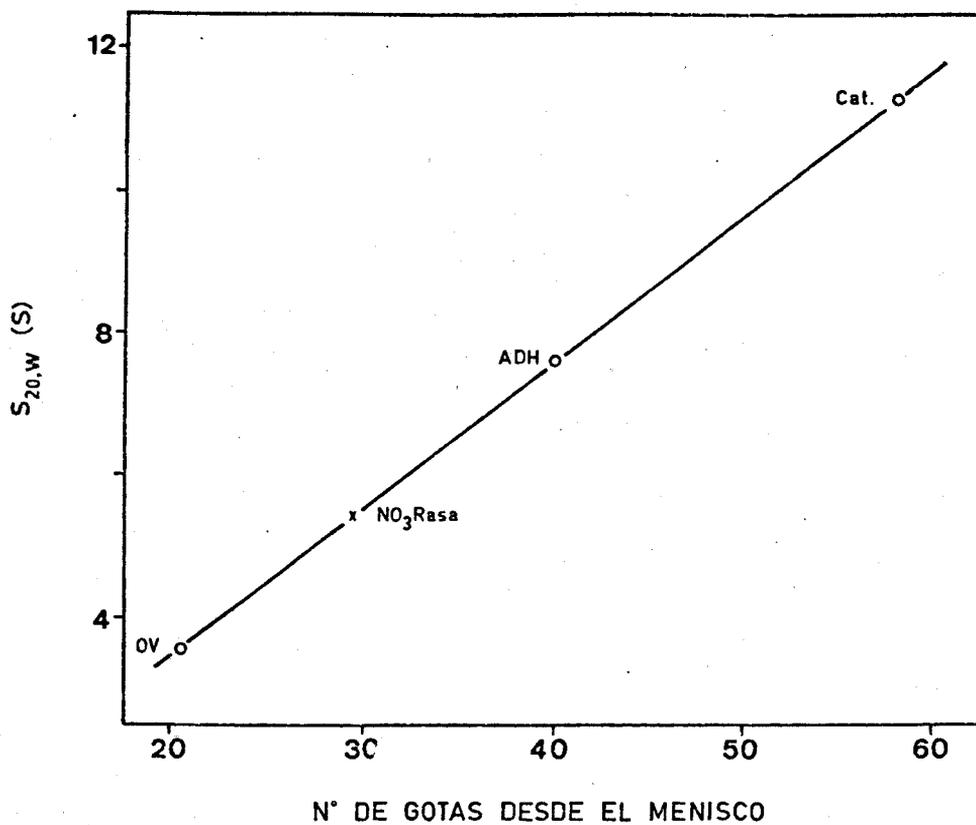


FIGURA 19. Determinación del coeficiente de sedimentación de la nitrato reductasa de *A. nidulans* por centrifugación en gradiente de sacarosa. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado II.C.2. .

$$s = 0,2067 \cdot x - 0,6775$$

con un coeficiente de correlación de 1,000, siendo s el coeficiente de sedimentación ($s_{20,w}$) y x el número de gotas contadas a partir del menisco.

Utilizando esta ecuación y la magnitud del desplazamiento de la nitrato reductasa (29,5 gotas) se obtuvo un valor para el coeficiente de sedimentación de 5,42 S.

III.E.1.2. *Radio de Stokes de la nitrato reductasa*

Para la determinación del radio de Stokes de la nitrato reductasa, se siguió el procedimiento de Siegel y Monty (1966) según se detalla en Materiales y Métodos. La nitrato reductasa homogénea (1,25 U) se sometió dos veces a filtración por el lecho de Sephadex G-150, una vez sola y otra junta a citochrome c y alcohol deshidrogenasa. Esta última proteína se pasó además por la columna independientemente, al igual que se hizo con los otros marcadores, seroalbúmina y ovoalbúmina.

Los resultados obtenidos se representan en la Figura 20. Los valores de radio de Stokes correspondientes a los marcadores se ajustan a una recta de ecuación:

$$(-\log K_{av})^{1/2} = 0,2754 + 0,0127 a$$

con un coeficiente de correlación de 0,999, donde a es el valor del radio de Stokes. A partir de ella se calcularon valores para la nitrato reductasa de 32,17 y 31,80 Å, tomándose

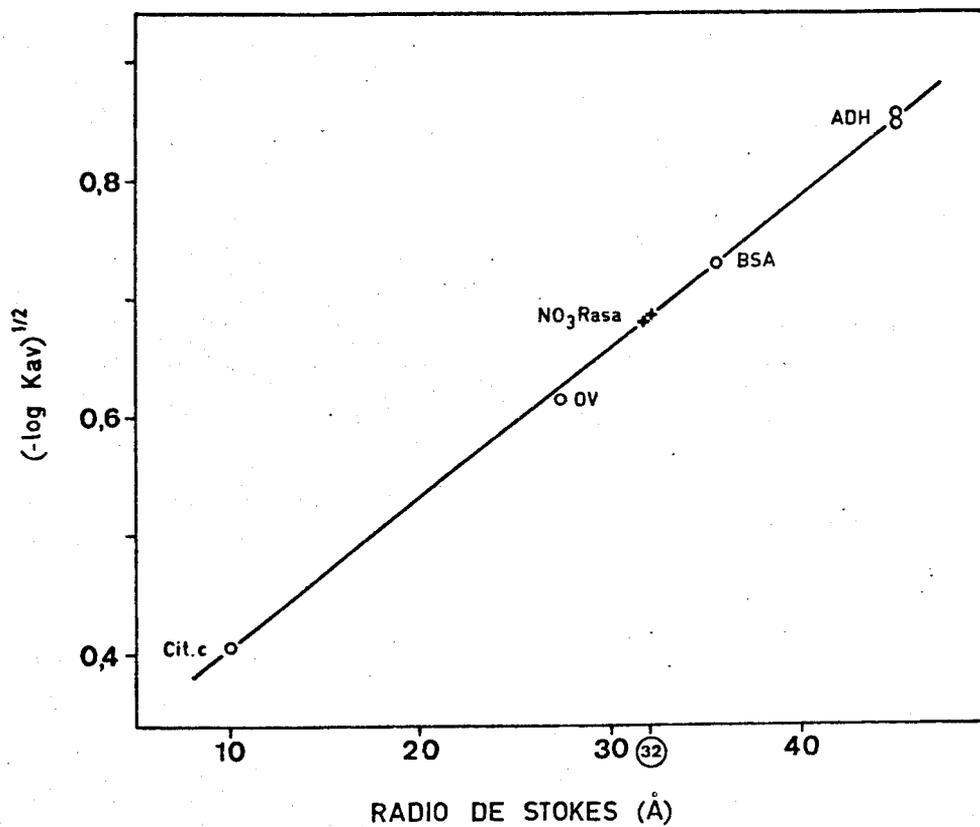


FIGURA 20. Determinación del radio de Stokes de la nitrato reductasa de *A. nidulans* por cromatografía de filtración en Sephadex G-150. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado II.C.4.

el valor medio, $31,99 \text{ \AA}$ como el correspondiente al radio de Stokes del enzima.

III.E.1.3. *Peso molecular de la nitrato reductasa nativa*

La Figura 21 muestra la representación de los logaritmos del peso molecular de las proteínas marcadoras frente al volumen de elución de cada una de ellas (Andrews, 1964) en un lecho de Sephadex G-150. La relación es lineal, ajustándose a una recta de ecuación:

$$\log PM = 7,111 - 0,030 \cdot V_e$$

donde V_e es el volumen de elución, con un coeficiente de correlación de 1,000.

A partir de los dos volúmenes de elución (74,69 y 75,05 ml) determinados para la nitrato reductasa, se calculó un peso molecular medio de 68.370 D.

El peso molecular de la nitrato reductasa se estimó también por el método de Siegel y Monty (1966), combinando los resultados obtenidos de radio de Stokes y coeficiente de sedimentación.

La fórmula empleada fué:

$$PM = 6 \pi \eta N a^3 / (1 - \bar{v} \rho)$$

donde PM corresponde a peso molecular; η , viscosidad del medio, calculada como 1,0348 cp; N, número de avogadro; a , radio de

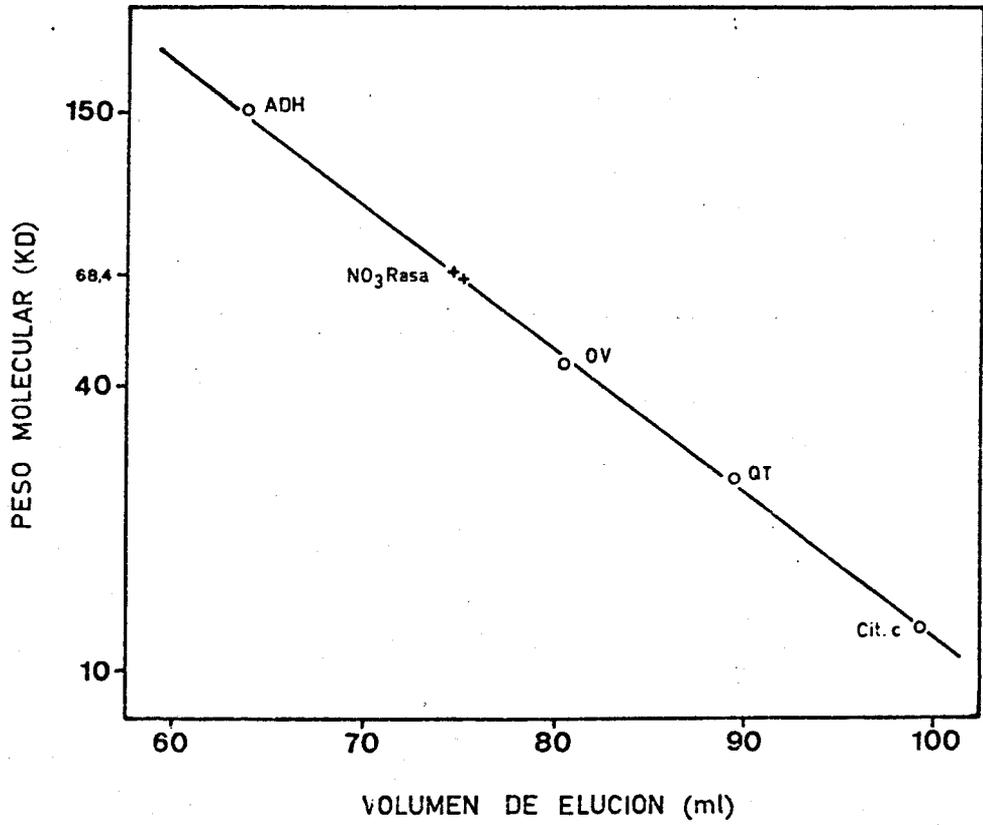


FIGURA 21. Estimación del peso molecular de la nitrato reductasa de *A. nidulans* por cromatografía de filtración en Sephadex G-150. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado II.C.5.

Stokes ($31,99 \text{ \AA}$); S , coeficiente de sedimentación ($5,42 \text{ S}$); \bar{v} , volumen parcial específico, asumido como $0,725 \text{ cm}^3/\text{g}$ (Martin y Ames, 1961); y ρ , la densidad del medio, calculada como $1,00462 \text{ g/cm}^3$.

El peso molecular calculado por este procedimiento, que puede considerarse de mayor precisión que el anteriormente citado, fué de 75.000 D.

III.E.1.4. *Estimación de número de subunidades y peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS*

Preparaciones homogéneas de ferredoxina-nitrato reductasa de *A. nidulans* se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS como se describe en el apartado II.C.11. La presencia de una sólo banda de proteína en los geles confirman la pureza de la preparación enzimática, a la vez que pone de manifiesto la contribución a la estructura proteica del enzima de una única cadena polipéptica, o bien de varias del mismo tamaño y, por consiguiente de la misma movilidad electroforética en estas condiciones.

A fin de calcular el peso molecular de la o las posibles cadenas polipépticas, se sometieron simultáneamente a electroforesis en presencia de SDS el enzima y varias proteínas marcadoras con cadenas polipeptídicas de peso molecular conocido. La Figura 22 muestra el resultado obtenido al representar la movilidad relativa al quimotripsinógeno de fosfori-

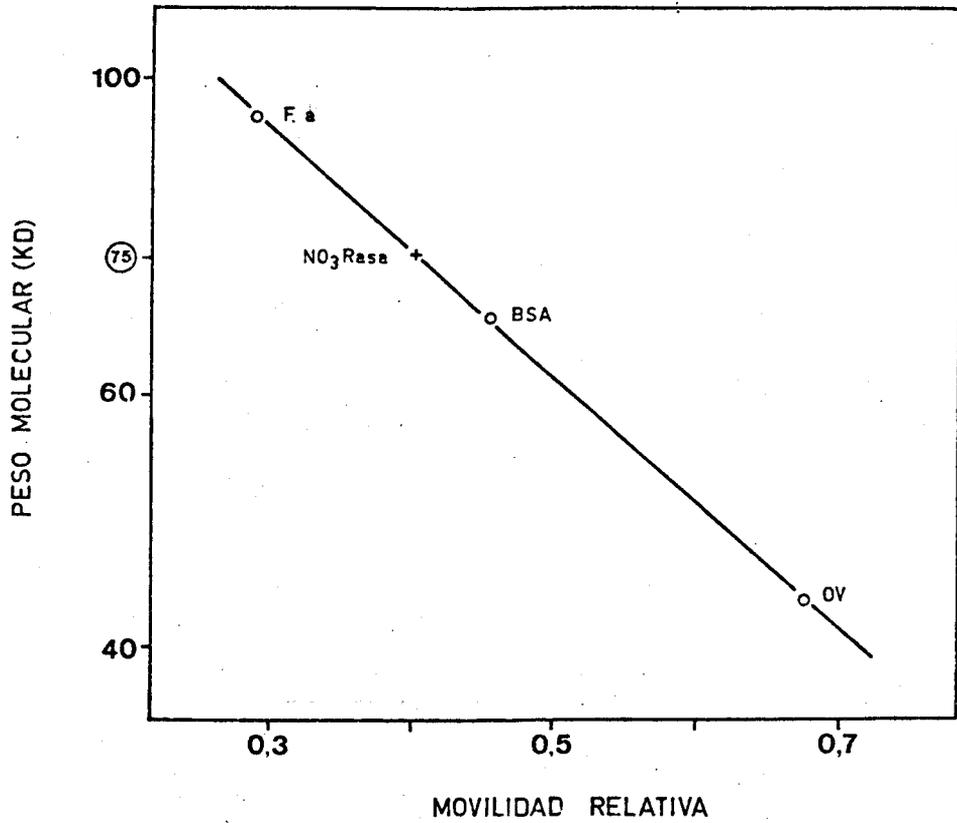


FIGURA 22. Determinación del peso molecular de la cadena polipeptídica de la nitrato reductasa de *A. nidulans* por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS. Las condiciones experimentales se detallan en el apartado II.C.11.

lasa α , seroalbúmina bovina, y ovoalbúmina, frente al logaritmo de sus pesos moleculares respectivos. Los valores obtenidos se ajustan a una recta de ecuación:

$$\log PM = 5,2306 - 0,8814 \cdot \text{movilidad relativa}$$

con un coeficiente de correlación de 1,000. A partir de esta ecuación y del valor obtenido de movilidad relativa para la banda de proteína correspondiente a la nitrato reductasa, se calculó para ésta un peso molecular de 74.970 D. Dado que para el enzima nativo se había calculado previamente un peso molecular de 75.000 D, puede afirmarse que la ferredoxina-nitrato reductasa de *A.nidulans* está constituida por única cadena polipeptida, cuyo peso molecular queda así fijado por distintos criterios en 75.000 D.

III.E.2. Otras propiedades de la nitrato reductasa

III.E.2.1. *Espectro de absorción de la nitrato reductasa de A. nidulans*

La Figura 23A muestra el espectro de absorción entre 250 y 700 nm de una preparación homogénea de nitrato reductasa de *A. nidulans* (2,12 μ M). Además del pico de proteína a 273 nm, se observa una disminución generalizada de la absorbancia a medida que aumenta la longitud de onda. No aparece en este espectro ninguna indicación de la presencia de hemo o flavina en la preparación, tanto en el caso del espectro del enzima oxidado mostrado en la figura, como cuando se añadía a la cubeta algunos cristales de ditionito sódico. La adición de un ex-

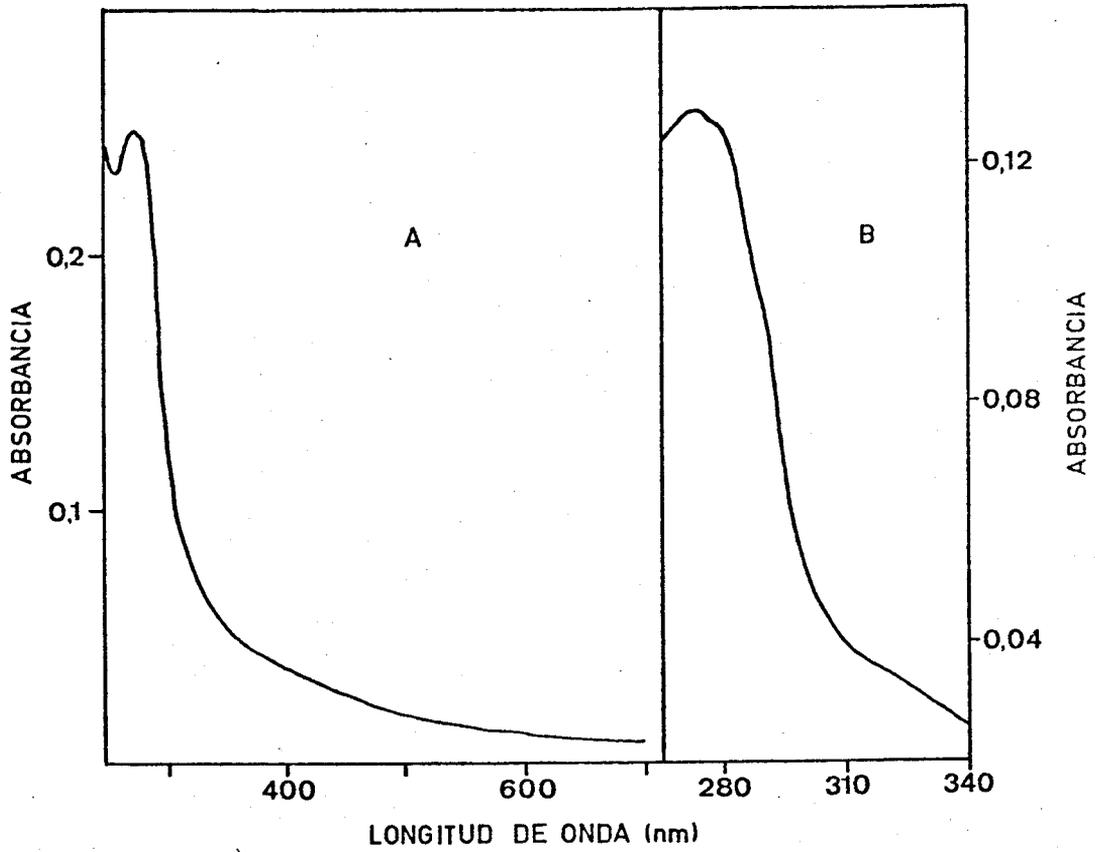


FIGURA 23. Espectro de absorción de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. A: enzima puro 2,12 μM en T25. B: detalle de la zona ultravioleta, concentración de enzima 1,02 μM .

ceso molar de ferredoxina, nitrato o ditionito, tanto individualmente como en cualquier combinación, no provocaba ninguna variación observable en la zona comprendida entre 400 y 610 nm, utilizando una preparación 1 μM de enzima y una sensibilidad de $1,97 \cdot 10^{-3}$ unidades de absorbancia por cm de carta.

La Figura 23B muestra, en mayor detalle, la absorción de la zona comprendida entre 265 y 340 nm presentada por una preparación 1 μM de nitrato reductasa de *A. nidulans*. Puede apreciarse un pequeño valle a 277 nm dentro del pico cuyo máximo es 273 nm. Igualmente se observan hombros en la zona de 288-290 nm y 325-326 nm.

A partir de la absorbancia de preparaciones homogéneas de nitrato reductasa de *A. nidulans*, se ha calculado para esta proteína en tampón Tris-ClH, pH 8,5, 25 mM, un coeficiente de extinción a 273 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}}$) de 1,69, y empleando un peso molecular de 75 KD (apartado III.E.1.3.), un coeficiente de extinción milimolar a esa misma longitud de onda ($E_{1\text{cm}}^{1\text{mM}}$) de 126,5.

III.E.2.2. Efecto de la concentración de nitrato sobre la actividad MV-nitrato reductasa del enzima purificado

La Figura 24 se muestra la representación de Lineweaver-Burk correspondiente al efecto de distintas concentraciones de nitrato sobre las velocidades de reacción, en el ensayo de la actividad MV-nitrato reductasa, de una preparación de enzima puro. El valor de K_m calculado fué de 0,69 mM.

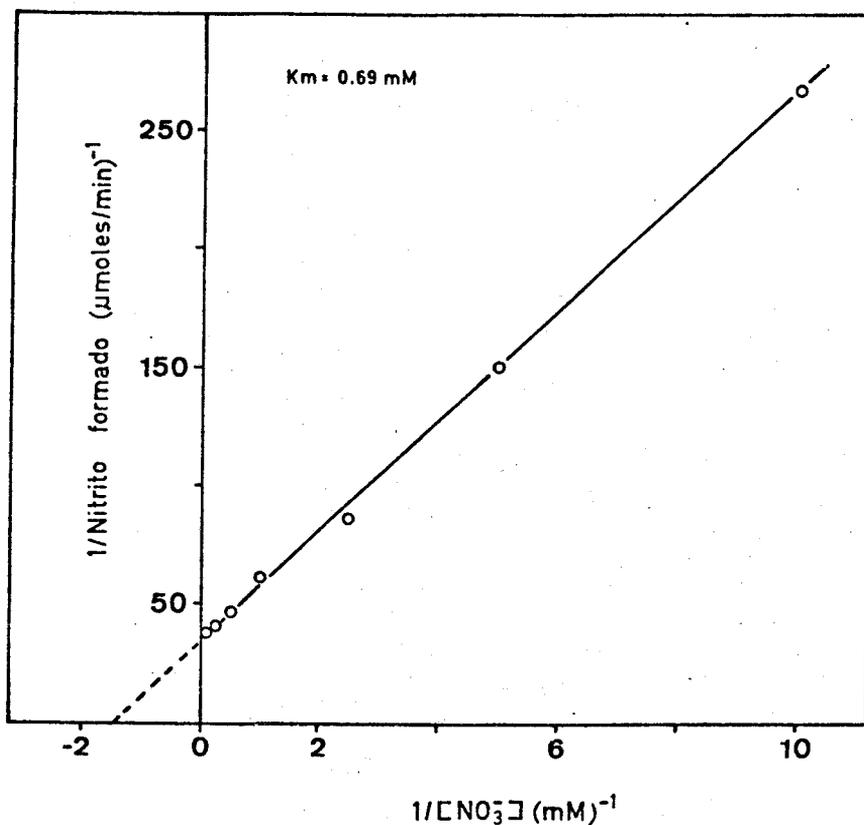


FIGURA 24. K_m para el nitrato de la nitrato reductasa purificada de *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las del ensayo standard de actividad MV-nitrato reductasa (apartado II.B.8.1.), excepto que las concentraciones de nitrato fueron las que se indican y que el tiempo de ensayo fué de 3 min. Nitrato reductasa pura, 24 mg.

III.E.2.3. *Efecto de la concentración de nitrato en la actividad MV-nitrato reductasa determinada in situ*

Como control de que el enzima no había sido dañado significativamente durante el proceso de purificación, sufriendo cambios en la conformación nativa que afectasen su actividad catalítica, se estudió la afinidad del enzima por el nitrato *in situ*, a fin de compararla con la del enzima puro. La Figura 25 muestra la representación de los recíprocos de las concentraciones de nitrato empleadas y de las velocidades correspondientes, determinadas *in situ* en células de *A. nidulans* tratadas con tolueno como se indica en el apartado II.B.8.2. El valor de K_m calculado, 0,73 mM es muy similar al obtenido para el enzima puro, 0,69 mM.

III.E.2.4. *Correlación entre cantidad de enzima y actividad nitrato reductasa*

Al representar la actividad nitrato reductasa, determinada por cualquiera de los métodos descritos, frente a la cantidad de enzima añadido, se observa la existencia de una proporcionalidad estricta entre ambos parámetros. Como ejemplo de esta observación puede tomarse la recta control de la Figura 35 en la que se representa actividad MV-nitrato reductasa frente a la cantidad de enzima añadido. El coeficiente de correlación hallado al calcular la recta de regresión fué, en este caso, de 1,000.

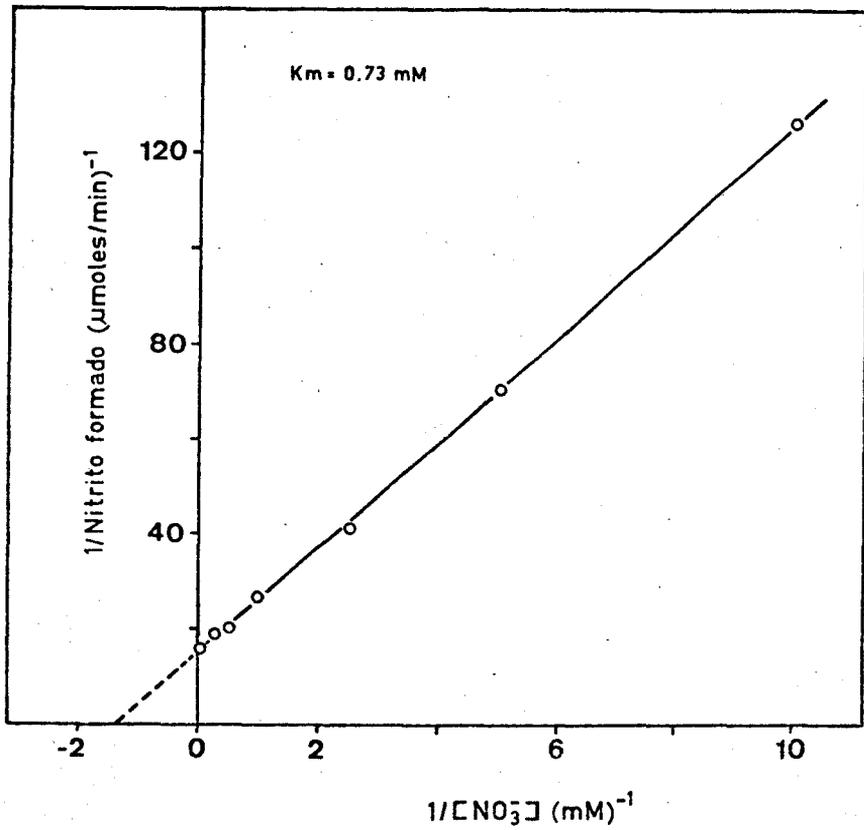


FIGURA 25. K_m para el nitrato en células toluenizadas de *A. nidulans*. Las condiciones experimentales fueron las del ensayo de actividad MV-nitrato reductasa *in situ* (apartado II.B.8.2.) excepto que las concentraciones de nitrato son las que se indican y que el tiempo de ensayo fue de 3 min. Células toluenizadas, 1,4 μl v.c.e.

III.E.2.5. Efecto de la temperatura sobre la actividad nitrato reductasa

La actividad MV-nitrato reductasa de una preparación homogénea del enzima se ensayó a distintas temperaturas en el intervalo comprendido entre 10 y 40°C. Se observó un marcado aumento de la actividad con la temperatura, alcanzándose un máximo a 36°C, a partir del cual la actividad disminuye, lo que probablemente se debe a desnaturalización térmica de la proteína.

En la Figura 26 se muestra la representación de Arrhenius de las velocidades iniciales determinadas a cada temperatura. Los puntos obtenidos se ajustan a dos rectas, A para la zona de 10 a 27°C, y B, de 27 a 36°C, con unos coeficientes de correlación de 0,996 y 0,966 respectivamente, habiéndose determinado que el punto de corte corresponde a una temperatura de 26,2°C.

A partir de las ecuaciones de las rectas de regresión A y B, se han calculado las energías de activación correspondientes, utilizando la fórmula:

$$E_a = \frac{R \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot \ln \frac{V_2}{V_1}}{T_2 - T_1}$$

donde E_a es la energía de activación (en cal/mol); R, la constante de los gases (1,987 cal/°K·mol); T_1 y T_2 , las temperaturas absolutas, y V_1 y V_2 las velocidades iniciales determinadas a las temperaturas T_1 y T_2 respectivamente. Los valores de energía de activación obtenidos son de 27,4 Kcal/mol para

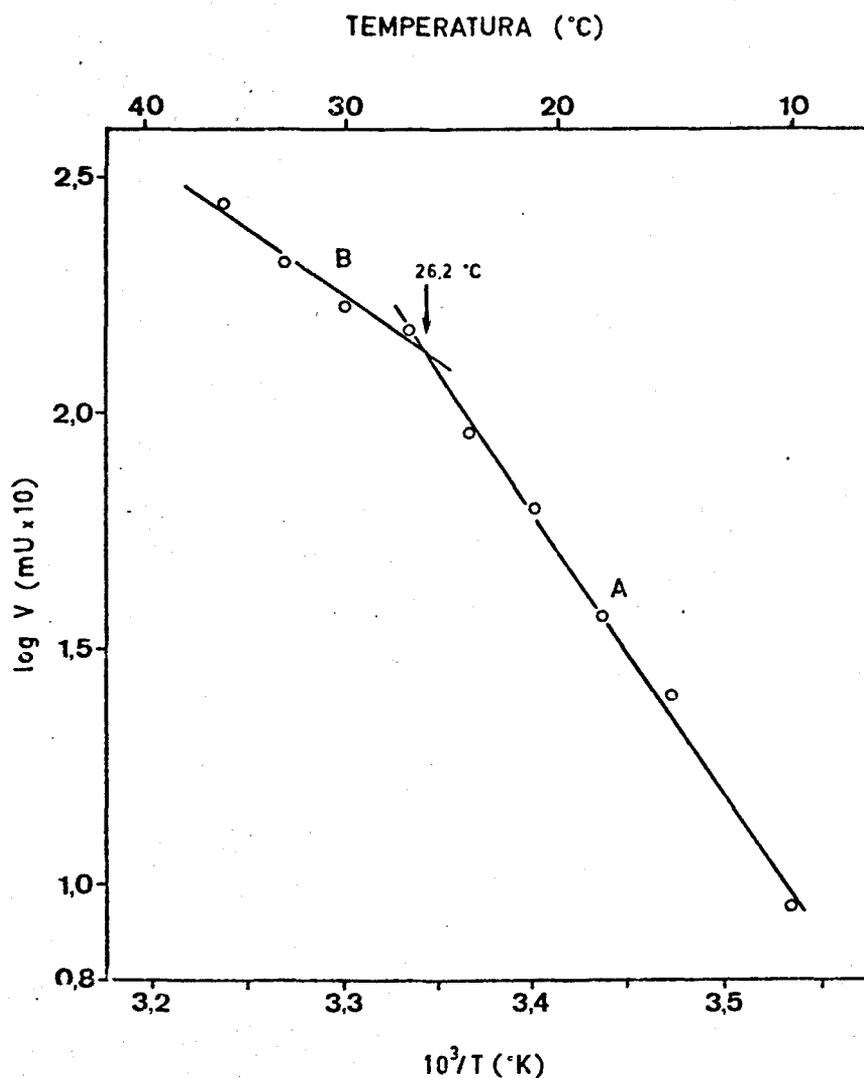


FIGURA 26. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Las condiciones fueron las mismas que las descritas para el ensayo standard de actividad con metilviológeno, excepto que el tiempo de reacción fué 2 min y que la temperatura se modificó como se indica. Nitrato reductasa pura, 19 ng.

el intervalo de 10 a 26,2°C y de 12,6 Kcal/mol para la zona de 26,2 a 36°C. Igualmente, se han calculado los valores de Q_{10} para ambos intervalos de temperatura, encontrándose que son de 4,98 (10 a 26,2°C) y de 1,97 (26,2 a 36°C).

III.E.2.6. *Estabilidad de la nitrato reductasa*

Se estudió la variación a lo largo del tiempo de las actividades MV-nitrato reductasa y Fd-nitrato reductasa de una preparación de nitrato reductasa parcialmente purificada (eluto de DE-52, dializado contra T25) mantenida a 0°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 27, donde puede observarse que las actividades permanecen inalteradas durante dos días aproximadamente, para luego ir disminuyendo de forma progresiva. La actividad MV-nitrato reductasa es más estable que la Fd-nitrato reductasa, pues mientras esta última cae al 25% de su valor inicial en 20 días, la actividad con metilviológeno se mantiene al 55% en el mismo periodo de tiempo.

La relación entre actividades con metilviológeno y ferredoxina permanece invariable, e igual a 22-23 veces mayor en el ensayo con metilviológeno, durante 5-6 días, aumentando considerablemente a partir de ese momento.

La actividad MV-nitrato reductasa era aún más estable cuando se trataba de enzima altamente purificado. Por ejemplo, una preparación de enzima puro conteniendo 32 μ g de proteína por ml de T25, conservaba el 62% de su actividad al cabo de un año de mantenimiento a 2-4°C (Fig. 28).

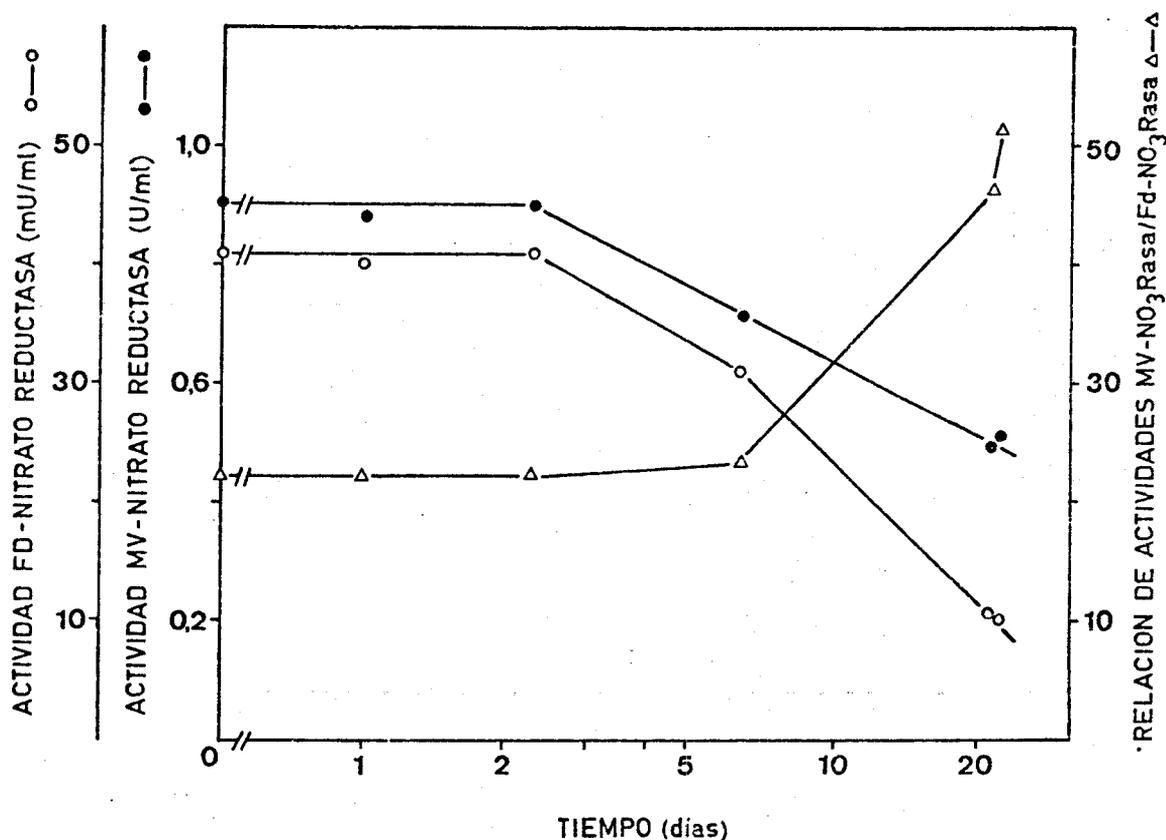


FIGURA 27. Variación respecto al tiempo de las actividades enzimáticas con metilviológeno y ferredoxina de una preparación parcialmente purificada de nitrato reductasa de *A. nidulans*. Una preparación de nitrato reductasa purificada hasta el nivel de eluato de DEAE-celulosa (apartado III.D.1.3.) y dializada frente a tampón T25, se mantuvo a una temperatura entre 0 y 4°C, ensayándose su actividad con metilviológeno y con ferredoxina (apartados II.B.8.1. y II.B.8.3.) en alícuotas tomadas a los tiempos que se indican.

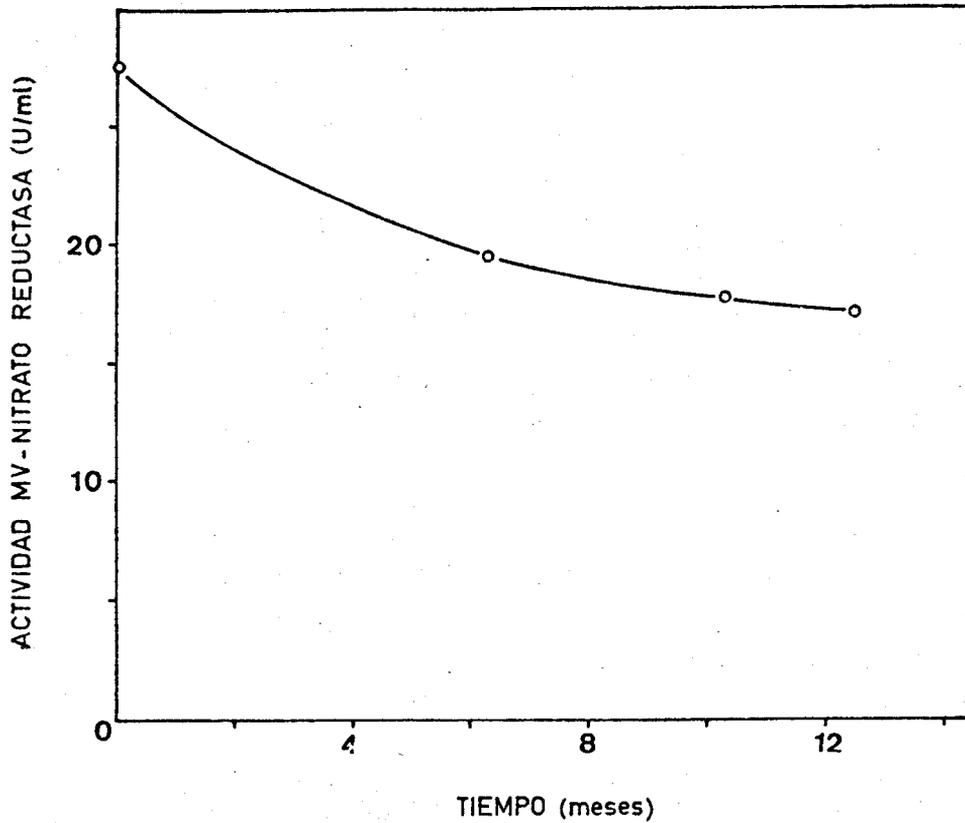


FIGURA 28. Estabilidad de la actividad con metilviológeno de una preparación homogénea de nitrato reductasa de *A. nidulans*. La actividad de alícuotas tomadas a los tiempos que se indican de una preparación homogénea de nitrato reductasa mantenida entre 0 y 4°C, se determinó en las condiciones del ensayo standard.

III.E.2.7. *Acción de suero anti-nitrato reductasa de Chlorella vulgaris sobre la nitrato reductasa de A. nidulans*

Para estimar la posible semejanza antigénica existente entre la nitrato reductasa de *A. nidulans* y el enzima de algas verdes, se preincubó durante 15 min a temperatura ambiente una alícuota de nitrato reductasa de *A. nidulans* parcialmente purificada con suero anti-nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*, a una concentración final de 20 mg de suero por ml de tampón fosfato potásico, pH 7,0, 100 mM conteniendo ClNa, 154 mM. El ensayo se llevó a cabo como se indica en el apartado II.B.8.1., sin que se hallaran diferencias en actividad entre el enzima preincubado con el suero y los correspondientes controles. En las condiciones de preincubación utilizadas, la actividad NADH-nitrato reductasa del enzima de *C. vulgaris* se inhibía totalmente, encontrándose fuertemente disminuida incluso cuando se preincubaba con el suero diluido 32 veces (23% del control).

III.F. PARTICIPACION DE METALES EN LA ACTIVIDAD CATALITICA DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Anacystis nidulans*

A falta de obtener las cantidades de proteínas necesarias para poder llevar a cabo un estudio completo de los posibles componentes metálicos del enzima, se han realizado experimentos que aportan evidencias de tipo indirecto acerca de la participación de molibdeno e hierro en la actividad de la nitrato reductasa de *A. nidulans*.

Las evidencias de un papel para el molibdeno descansan en experimentos de competencia con volframio, análogo estructural del molibdeno, mientras que las de una posible participación del hierro se basan en los efectos ejercidos sobre el enzima por reactivos específicos de este metal.

III.F.1. Efecto de la presencia de volframato en el medio de cultivo sobre el nivel celular de actividad nitrato reductasa de *A. nidulans*

Las células de *A. nidulans* presentan un crecimiento normal en medio con nitrato como fuente de nitrógeno y sin molibdeno añadido. Los niveles celulares de actividad nitrato reductasa son altos, incluso cuando las células utilizadas como inóculos provienen de una línea cultivada en medios con amonio como fuente de nitrógeno y sin adiciones de molibdeno (Figs. 29-31).

Cuando a un cultivo que crece en nitrato en estas condiciones de ausencia de molibdeno añadido se le añade volframio (análogo estructural del molibdeno) en la forma de WO_4Na_2 , se detectan niveles muy bajos de actividad celular nitrato reductasa. La Figura 29 muestra el resultado de un experimento en el que se añadieron distintas cantidades de WO_4Na_2 a cultivos creciendo en medios con nitrato y sin molibdeno añadido. Puede observarse que la presencia de volframio en el medio, a concentraciones tan bajas como $1 \mu M$, se traduce en bajos niveles de actividad nitrato reductasa, siendo la actividad enzimática prácticamente indetectable cuando la concentra

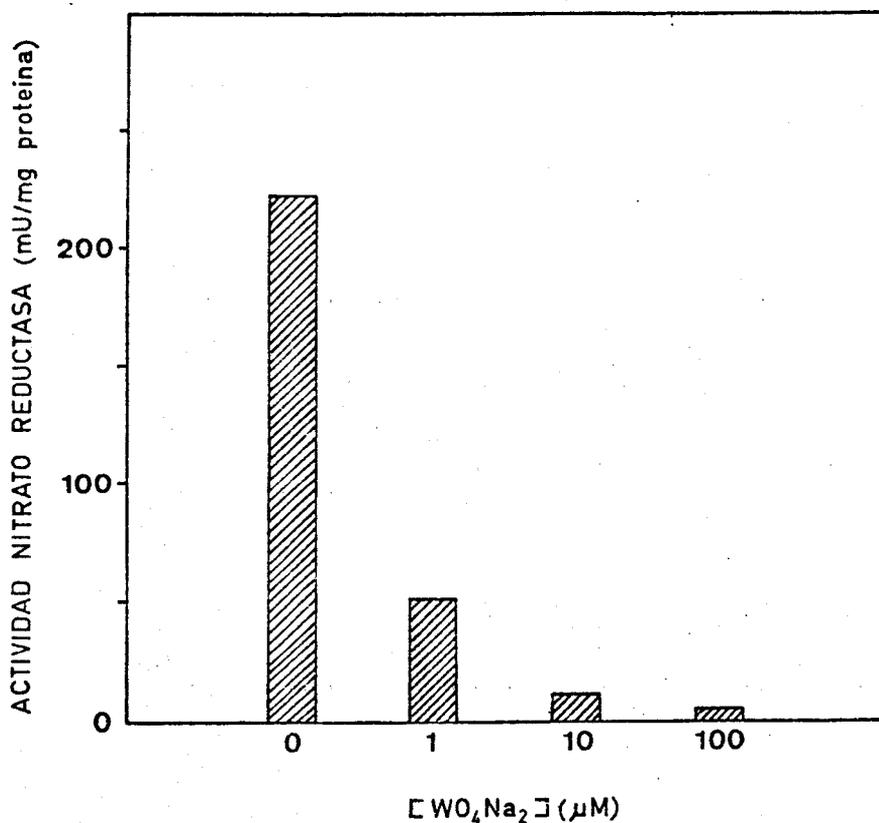


FIGURA 29. Efecto de la concentración de volframato añadido al medio en el nivel celular de actividad determinado *in vitro* de nitrato reductasa en *A. nidulans*. Células procedentes de una línea en amonio y sin molibdato añadido se transfirieron a medios con nitrato carentes de molibdato y suplementados con volframato sódico a las concentraciones que se indican. Tras 48 h de cultivo, se prepararon extractos celulares por tratamiento con ultrasonidos y centrifugación. La actividad nitrato reductasa se determinó en las condiciones del ensayo standard en alícuotas de los correspondientes sobrenadantes.

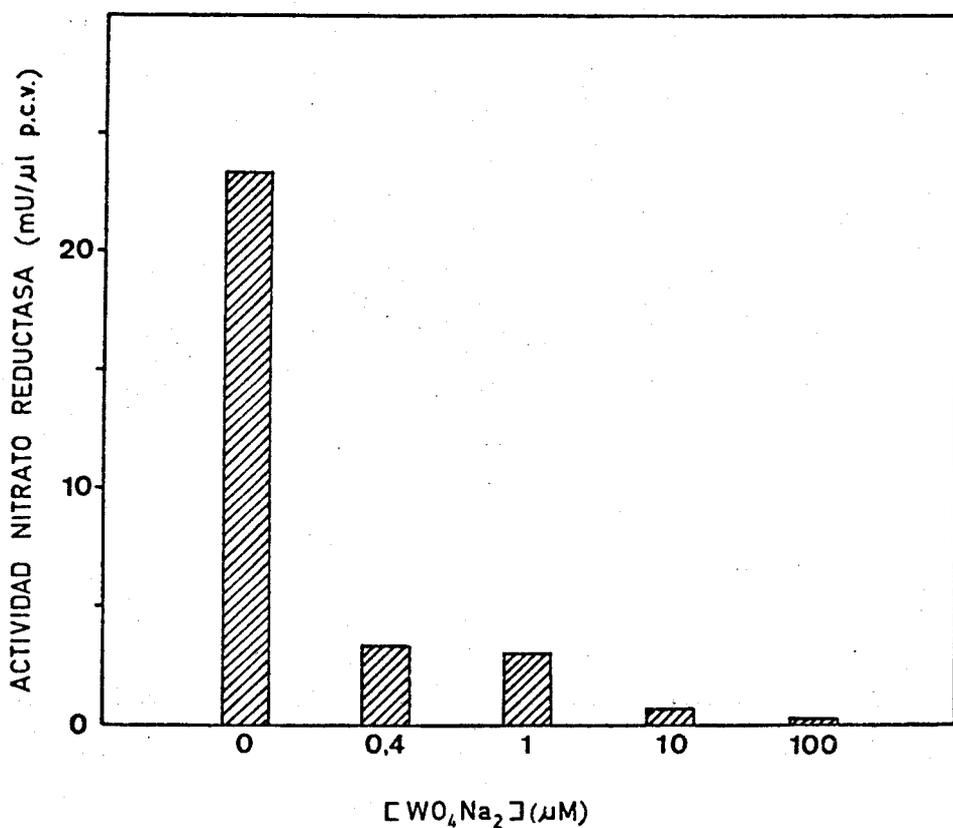


FIGURA 30. Efecto de la concentración de wolframato añadido al medio en el nivel celular de actividad nitrato reductasa de *A. nidulans* determinado *in situ*. Las condiciones fueron las mismas que las de Fig. 29, excepto que la determinación de actividad nitrato reductasa se efectuó en las condiciones del ensayo *in situ* (apartado II.B.8.2.)

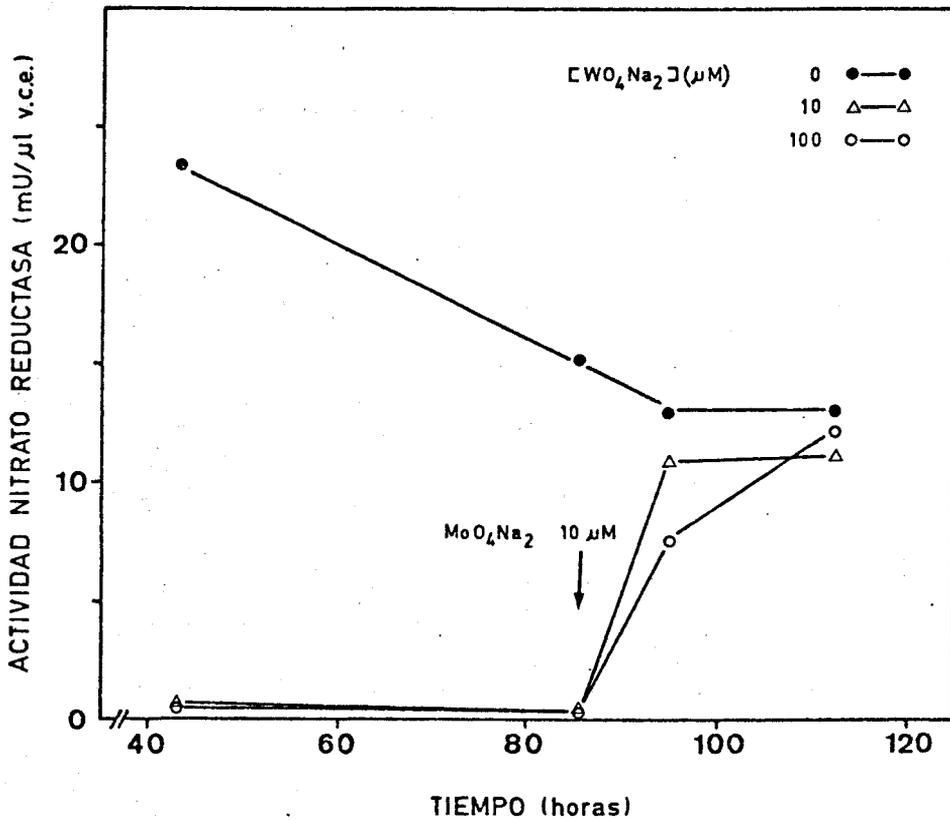


FIGURA 31. Reversión por molibdato del efecto del wolframato sobre el nivel celular de actividad nitrato reductasa en *A. nidulans*. Las condiciones fueron las mismas que las de Fig. 29, excepto que al tiempo indicado por la flecha se añadió, a los medios que contenían wolframato, molibdato sódico a una concentración final de 10 μM .

ción de WO_4Na_2 en el medio de cultivo alcanza valores de 100 μM .

El efecto observado es similar tanto cuando la determinación de la actividad nitrato reductasa se lleva a cabo en el extracto enzimático solubilizado de las membranas mediante tratamiento con ultrasonidos (Fig. 29), como cuando ésta se ensaya *in situ* (Fig. 30). En este último caso, puede observarse, además, que cantidades aún menores de WO_4Na_2 (0,4 μM) son suficientes para afectar en forma considerable los niveles de actividad nitrato reductasa.

Cuando a un cultivo que presenta niveles bajos de enzima, como consecuencia de la presencia de volframato en el medio de cultivo, se le añade una fuente de molibdeno (MoO_4Na_2), se observa un reversión casi total del efecto del volframato. En la Figura 31 se presentan los niveles celulares de actividad nitrato reductasa a lo largo del tiempo, apreciándose que el efecto del volframato es drástico y estable. Sin embargo, si en un momento dado se añade molibdeno a estos cultivos con volframato, la actividad enzimática se recupera hasta niveles similares al control, en un plazo de 25 a 30 h. Esta recuperación tiene lugar incluso sin haber eliminado el volframato que se encontraba presente en los cultivos a concentración hasta 10 veces superior al molibdato añadido.

III.F.2. Efecto de reactivos de hierro sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*

III.F.2.1. Efecto de dipiridilo, ferrozina y o-fenantrolina sobre la nitrato reductasa

A fin de dilucidar la posible participación de hierro en la transferencia de electrones desde el reductor al nitrato mediada por la nitrato reductasa de *A. nidulans*, se preincubó el enzima durante 10 min a 0°C, con tres reactivos conocidos por su afinidad por el hierro, a saber α, α' -dipiridilo, ferrozina y ortofenantrolina (Stookey, 1970). Los resultados obtenidos indicaban una total ausencia de efecto de estos compuestos a la concentración empleada, 1 mM, incluso tras periodos de incubación de hasta 15 h. En contraste con la falta de efecto observada en preincubaciones, estos reactivos de hierro afectan a la actividad nitrato reductasa cuando se encuentran presentes en el ensayo. La Tabla XVII muestra los resultados obtenidos en un experimento de este tipo. Puede observarse que todos los reactivos presentan una acción inhibitoria sobre la actividad, si bien en distinta extensión. Tanto el α, α' -dipiridilo como la ortofenantrolina parecen afectar sólo parcialmente a la nitrato reductasa (30-40% de inhibición), siendo la magnitud de su efecto similar a concentraciones 0,5 y 5 mM. El efecto de la ferrozina se considera con más detalle a continuación.

TABLA XVII

EFFECTO DE REACTIVOS DE HIERRO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA
DE *A. nidulans*

Reactivo	Concentración (mM)	Actividad (%)
ninguno	-	100
α, α' -dipiridilo	0,5	72,7
	5	69,9
ferrozina	5	2,2
ortofenantrolina	0,5	69,4
	5	57,7

El ensayo se llevó a cabo como se indica en el apartado II.B.8.1. pero añadiendo la concentración de inhibidor indicada. El 100% de actividad corresponde a 7,18 mU. Enzima, 8 ng.

III.F.2.2. *Efecto sobre la nitrato reductasa de la preincubación con ferrozina en condiciones reductoras*

Una de las diferencias existentes entre las condiciones de preincubación y ensayo es el estado de reducción de la mezcla de reacción. Las condiciones del ensayo, fuertemente reductoras, pueden mantener el hierro en estado ferroso, descrito como la especie iónica con la que se acomplejan los reactivos de hierro empleados (Stookey, 1970).

La Tabla XVIII presenta los resultados obtenidos al preincubar una preparación de nitrato reductasa con ferrozina (elegida por ser el inhibidor de efecto más contundente) en condiciones reductoras. La ferrozina a la concentración empleada (2 mM) causa una inhibición del 25% aproximadamente, que se duplica cuando la preincubación se realiza en condiciones reductoras.

III.F.2.3. *Efecto de la concentración de ferrozina sobre la actividad nitrato reductasa*

En la Figura 32 se representan los valores obtenidos al ensayar el enzima en presencia de concentraciones crecientes de ferrozina. Puede observarse que la inhibición causada, que a una concentración 0,75 mM del reactivo es sólo del 12%, pasa a ser del 84% a 1,5 mM, y del 98% a 2 mM. El hecho de que pequeños incrementos de la concentración de inhibidor provoquen grandes pérdidas de actividad, sugiere la participación simultánea de varias moléculas del mismo sobre la mo-

TABLA XVIII

EFFECTO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans* DE LA PREINCUBACION CON FERROZINA EN CONDICIONES REDUCTORAS

Preincubación		Actividad (%)
sin ditionito	sin ferrozina	100
	con ferrozina	74,4
con ditionito	sin ferrozina	91
	con ferrozina	43,9

La preincubación se llevó a cabo a 30°C durante 5 min, en una mezcla de reacción que contenía en un volumen final de 0,5 ml: tampón $\text{CO}_3^{=}/\text{CO}_3\text{H}^-$, pH 10,5, 50 μmoles ; metilviológeno, 2 μmoles ; y cuando se indica: ferrozina, 1 μmol ; $\text{S}_2\text{O}_4^{=}$, 0,49 μmoles con 30 μmoles de CO_3HNa . Enzima, 0,1 μg . Terminada la preincubación se ensayaba 0,1 ml del preincubado en las condiciones del ensayo standard de actividad MV-nitrato reductasa (II.B.8.1.). El 100% de actividad corresponde a 17 mU.

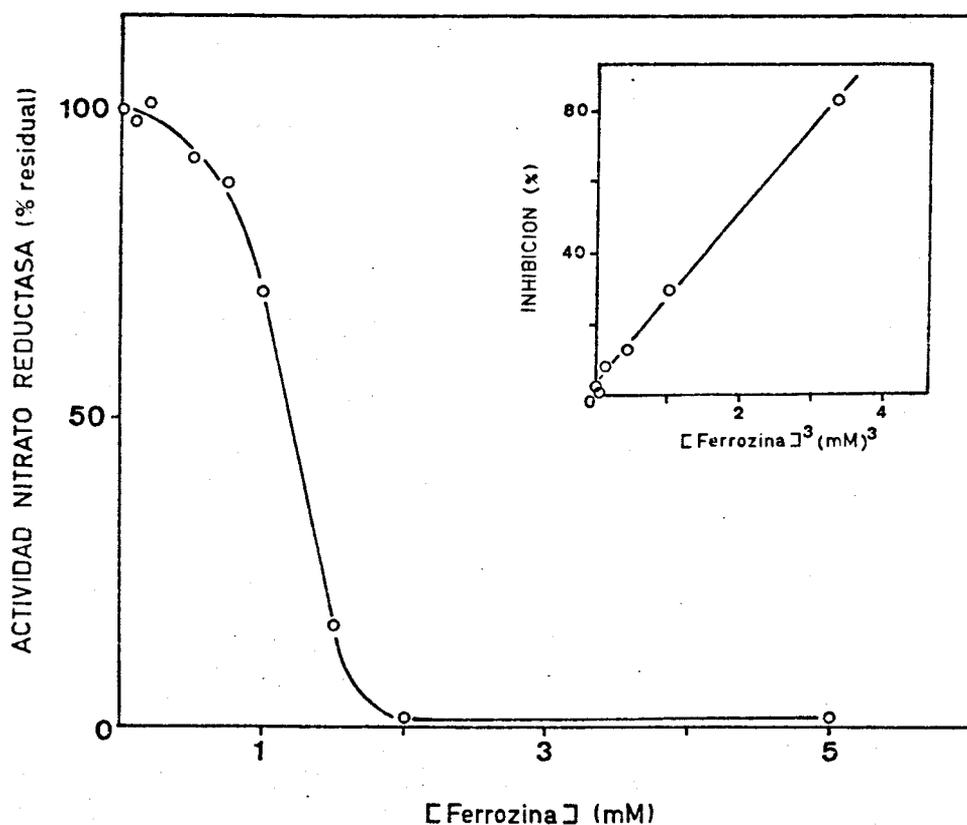


FIGURA 32. Efecto de la concentración de ferrozina sobre la actividad de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Alícuotas (13 ng proteína) de una preparación homogénea de nitrato reductasa se ensayaron en ausencia o presencia de ferrozina a las concentraciones que se indican en el apartado II.B.8.1.

lécua de enzima. En este sentido, se ha comprobado que existe una relación lineal entre la inhibición causada y el cubo de la concentración de inhibidor (recuadro interior de la Fig. 32).

III.G. EFECTO DE FERRICIANURO, SULFO-DSPD Y NADP^+ SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Anacystis nidulans*

III.G.1. Efecto del ferricianuro sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*

Al investigar la causa de la inactivación del enzima observada durante el ensayo de actividad MV-nitrato reductasa (Manzano, 1977), se pensó en unaposible inactivación por reducción de la nitrato reductasa de *A. nidulans*, similar a las descritas para otras nitrato reductasas (Losada y Guerrero, 1979) provocada, en este caso, por el ditionito presente en el ensayo. Cuando esta presunta inactivación por reducción se intentó revertir por medio de ferricianuro potásico, efectivo reactivador en los casos anteriormente citados, se observó que el ferricianuro no sólo no revertía la inactivación, sino que de por sí tenía un claro efecto inactivante sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*.

En la Tabla XIX se presenta el efecto causado por el ferricianuro sobre la nitrato reductasa, tanto en preincubación como en ensayo. Presumiblemente, la falta de efecto en el ensayo es debida a la reducción del ferricianuro a ferrocianuro que debe ocurrir a expensas del ditionito presente en la mezcla de reacción.

TABLA XIX

EFECTO DEL FERRICIANURO SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Tratamiento	Actividad relativa (%)
Control	100
1 mM ferricianuro en ensayo	101,6
1 mM ferricianuro en preincubación y ensayo	52,1

El ensayo se realizó como se indica en el apartado II.B.8.1. La preincubación se llevó a cabo durante 5 min a 30°C. El 100% de actividad corresponde a 12,1 mU. Enzima purificado, 14 ng.

III.G.1.1. *Cinética de la inactivación por ferricianuro de la nitrato reductasa*

El efecto observado de inactivación del enzima al preincubar con ferricianuro es una función del tiempo, como puede observarse en la Figura 33. La caída de la actividad es de tipo exponencial, con una vida media de aproximadamente 5 min. La máxima inactivación observada es del orden del 96%, sin que se alcance una inactivación total ni siquiera tras varias horas de preincubación. En el recuadro interior de la Figura 33 se representa el logaritmo del porcentaje de actividad remanente respecto al total susceptible a inactivación, en función del tiempo, observándose más claramente el carácter exponencial de la inactivación.

III.G.1.2. *Irreversibilidad aparente de la inactivación por ferricianuro*

Se han descrito efectos inactivantes del ferricianuro causados por oxidación de grupos sulfhidrilos (Webb, 1966), o removiendo el molibdeno de molibdoproteínas (Kessler y Rajagopalan, 1974). Se intentó revertir la inactivación de la nitrato reductasa preincubando un enzima inactivado al 90% (por tratamiento con ferricianuro 1 mM durante 35 min) con ditioeritritol (DTE), reactivo protector de grupos sulfhidrilos, y con molibdato sódico, tras haber eliminado previamente el exceso de ferricianuro por filtración en Sephadex G-25.

La eliminación del ferricianuro no tenía efecto alguno sobre la actividad del enzima, ni incluso tras quince

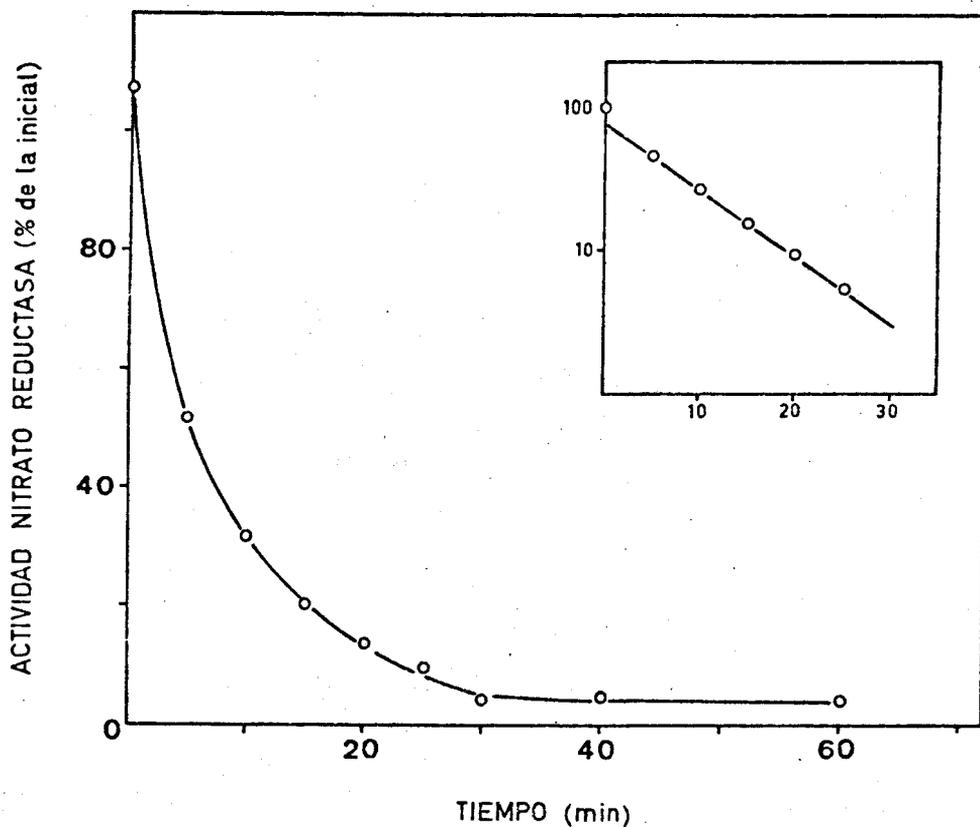


FIGURA 33. Cinética de la inactivación por ferricianuro de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Una alícuota de una preparación homogénea de nitrato reductasa se preincubó a 30°C con ferricianuro potásico 1 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas y se sometieron al ensayo standard de actividad. El 100% de actividad corresponde a 15 mU.

días de posible disociación del ferricianuro. La preincubación con DTE 4,5 mM durante 30 min no provocaba la reactivación del enzima, la cual tampoco tenía lugar tras preincubarlo durante 5 min con molibdato 6,7 mM. En este último caso se registró el hecho curioso de que el molibdato sólo, en las condiciones del ensayo standard de actividad MV-nitrato reductasa, reducía químicamente nitrato a una velocidad apreciable.

III.G.1.3. *Protección por ferrocianuro de la inactivación de la nitrato reductasa causada por el ferricianuro*

Cuando el enzima se preincubaba con ferricianuro 1 mM en presencia de 1 mM de ferrocianuro, se observaba una sensible protección, tal como se indica en la Tabla XX. Como puede verse, la inactivación causada por el ferricianuro que era de 70%, pasaba a ser sólo del 15% en presencia de ferrocianuro. Igualmente, se aprecia un pequeño estímulo (10%) del ferrocianuro sobre la actividad nitrato reductasa.

Para ver si el efecto protector del ferrocianuro era debido a razones cinéticas de competencia con el ferricianuro o a alterar el potencial del sistema, haciéndolo más negativo, se realizó el experimento reflejado en la Tabla XXI. En ella se observa que el efecto protector del ferrocianuro se dá a concentraciones tan bajas como 0,1 mM, y permanece inalterado aun que se incremente su concentración 100 veces (10 mM). Este hecho parece indicar que la protección por ferrocianuro es debida a hacer menos positivo el potencial de la mezcla de preincubación, lo que ya se conseguiría a concentraciones muy bajas

TABLA XX

EFFECTO PROTECTOR DEL FERROCIANURO EN LA INACTIVACION POR
FERRICIANURO DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Preincubación	Actividad relativa (%)
Enzima solo	100
con ferricianuro 1 mM	29,2
con ferrocianuro 1 mM	112,8
con ferricianuro 1 mM y ferrocianuro 1 mM	84,4

El ensayo se realizó como se indica en el apartado II.B.8.1. tras preincubar el enzima en presencia de los compuestos indicados durante 10 min a 30°C. El 100% de actividad corresponde a 14 mU. Enzima purificado, 14 ng.

TABLA XXI

EFFECTO DE LA RELACION FERRICIANURO/FERROCIANURO EN LA
INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Preincubación			Actividad relativa
Ferricianuro (mM)	Ferrocianuro (mM)	Relación Ferri./Ferro.	(%)
0	0	-	100,0
1	0	$\rightarrow \infty$	29,8
1	0,1	10	80,1
1	1	1	78,4
1	10	0,1	81,0
0	0,1, 1, 10	$\rightarrow 0$	110,9

El ensayo se llevó a cabo como se indica en el apartado II.B.8.1. Las preincubaciones se llevaron a cabo a 30°C durante 10 min. El 100% de actividad corresponde a 22,1 mU. Enzima purificado, 26 ng.

de ferrocianuro, más que a efectos de competencia con el ferric₂ cianuro, que se debían ver afectados por cambios de concentración tan grandes.

El nitrato, empleado en preincubación a diferentes concentraciones, no presenta efecto protector de la nitrato reductasa ante la inactivación por ferric₂ cianuro.

III.G.2. Efecto del Sulfo-DSPD sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*

La acción que el Sulfo-DSPD ejerce sobre la fotorreducción de nitrato (35% de inhibición a una concentración 4 mM, apartado III.A.1.) parece deberse, principalmente, al efecto que como quelante de metales (Izawa, 1977) tiene sobre la nitrato reductasa.

En la Tabla XXII se muestra la acción de diferentes concentraciones de Sulfo-DSPD sobre la actividad MV-nitrato reductasa de preparaciones de membranas de *A. nidulans*, observándose un 50% de inhibición para una concentración de Sulfo-DSPD de 6 mM.

III.G.3. Efecto del NADP⁺ sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*

Al estudiar el efecto que ejercían sobre la reducción fotosintética de nitrato diversos compuestos capaces de bloquear o interferir con el paso de los electrones desde el fotosistema I a la ferredoxina y de ésta a la nitrato reduc-

TABLA XXII

EFFECTO DEL SULFO-DSPD SOBRE LA ACTIVIDAD MV-NITRATO REDUCTASA
DE *A. nidulans*

Concentración Sulfo-DSPD (mM)	Actividad relativa nitrato reductasa (%)
0	100
0,76	95,6
2,27	85,2
6,06	51,5
12,12	41,9

Las condiciones de ensayo son las descritas en el apartado II.B.8.1., excepto que se añadió Sulfo-DSPD a las concentraciones indicadas. Enzima particulado conteniendo 20 µg de clorofila. El 100% de actividad corresponde a 25,7 mU.

tasa (véase apartado III.A.1.), se observó una fuerte inhibición por el NADP^+ de la fotorreducción de nitrato. Cuando se ensayó el efecto que el NADP^+ tenía sobre la nitrato reductasa *in vitro*, se registraron inhibiciones prácticamente similares a las causadas en el ensayo fotosintético de reducción de nitrato (Tabla XXIII).

Igualmente se comprobó que la acción del NADP^+ sobre el enzima tenía lugar durante el ensayo sin que se apreciase efecto alguno preincubando el enzima con NADP^+ a diversas concentraciones y por espacios de tiempo de hasta 6 h de duración. La presencia de ditionito sódico en la preincubación con NADP^+ tampoco afectaba la actividad de la nitrato reductasa.

Como se observa en la Tabla XXIV el efecto inhibitor del NADP^+ es específico de la forma oxidada del nucleótido, sin que la forma reducida (NADPH) cause inhibiciones notables a la misma concentración. Asimismo, se ha encontrado que también el NAD^+ afecta a la actividad nitrato reductasa, aunque en menor grado que el NADP^+ (40% de inhibición a 2 mM de NAD^+ , frente a 50% para la misma concentración de NADP^+).

Para investigar si la inhibición dependía sólo de la concentración absoluta de NADP^+ o, si por el contrario era función de la razón de concentraciones de las formas oxidada y reducida de NADP , se realizó el experimento reflejado en la Tabla XXV. Los resultados indican que la acción del NADP^+ es independiente de la presencia de NADPH en la mezcla de reacción.

TABLA XXIII

EFFECTO DEL NADP^+ SOBRE LA REDUCCION FOTOSINTETICA DE NITRATO
Y LA ACTIVIDAD MV-NITRATO REDUCTASA DE UNA PREPARACION
PARTICULADA DE *A. nidulans*

Adición	Actividad relativa (%)	
	<u>Fotoproducción de nitrito</u>	<u>MV-nitrato reductasa</u>
Ninguna	100	100
NADP^+ (2 mM)	55,3	58

Los ensayos se llevaron a cabo como se indica en los apartados II.B.8.1. y II.B.8.4. Preparación particulada, 138 μg de clorofila. El 100% de actividad corresponde a 5 mU en el caso del ensayo fotosintético y 49,8 mU en el ensayo con metilviológeno.

TABLA XXIV

ESPECIFICIDAD DE LA FORMA OXIDADA DEL NADP PARA LA INHIBICION
DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

Adición	Actividad relativa nitrato reductasa (%)
Ninguna	100
NADP ⁺	50,6
NADPH	95,2

El ensayo se realizó en las condiciones descritas en el apartado II.B.8.1., excepto que donde se indica se añadió NADP⁺ ó NADPH a una concentración final 2 mM. El 100% de actividad corresponde a 14,2 mU. Enzima puro, 16,4 ng.

TABLA XXV

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NADPH EN LA INHIBICION POR NADP⁺
DE LA NITRATO REDUCTASA DE *A. nidulans*

{NADP ⁺ } (mM)	{NADPH} (mM)	Actividad relativa nitrato reductasa (%)
0	0	100
2	0	54,6
2	0,5	58,0
2	1	55,1
2	2	61,1

El ensayo se realizó como se indica en el apartado II.B.8.1., excepto que se añadieron NADP⁺ y NADPH a las concentraciones indicadas. El 100% de actividad corresponde a 17,7 mU. Enzima puro, 20 ng.

III.G.3.1. Tipo de inhibición causada por el NADP^+

En la Figura 34 se muestran, utilizando la representación de Woolf-Augustinsom-Hofstee, los resultados obtenidos al ensayar el enzima con distintas concentraciones de nitrato, tanto en presencia como en ausencia de NADP^+ . De la relación existente entre las pendientes de ambas rectas, 1,04, se deduce que la inhibición ejercida es del tipo no competitivo, caso en el que cabría esperar una relación entre pendientes de 1,0. En el cálculo de la recta de regresión correspondiente al NADP^+ no se ha tenido en cuenta el valor de menor velocidad, aplicando el criterio de Chauvenet de rechazo de valores muy alejados de la media (Brewer *et al.*, 1974). A partir de los valores de velocidad máxima obtenidos de las intersecciones de ambas rectas con el eje de ordenadas, se ha calculado una K_i para el NADP^+ igual a 2,04 mM.

Como confirmación de que la acción ejercida por el NADP^+ sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans* era la de un inhibidor no competitivo y no la de un inhibidor irreversible se llevó a cabo el experimento que se presenta en la Figura 35. El hecho de que al representar cantidad de enzima frente a actividad, en presencia y ausencia de NADP^+ , se obtengan dos rectas de distinta pendiente y que pasan por el origen, indica que la inhibición es reversible y de tipo no competitivo. Si la inhibición fuese irreversible se obtendrían dos rectas de igual pendiente, de las cuales sólo la correspondiente a ausencia de inhibidor pasaría por el origen (Segel, 1975).

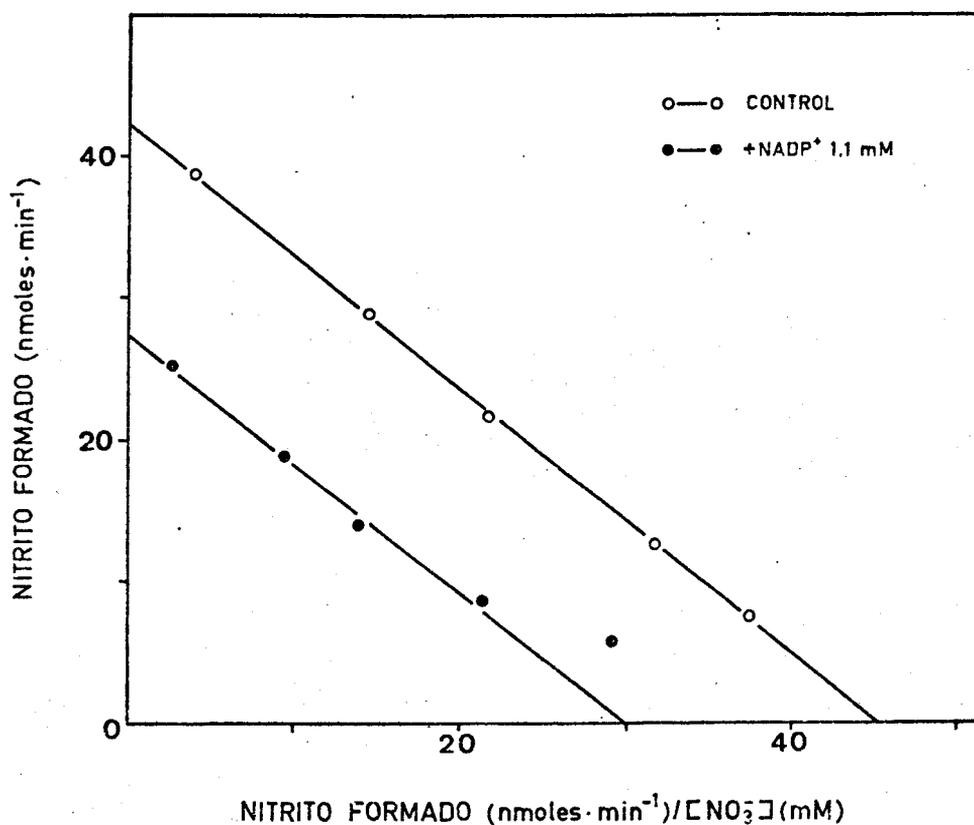


FIGURA 34. Inhibición no competitiva por $NADP^+$ de la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Las condiciones fueron las mismas descritas para el ensayo standard de actividad, excepto que se varió la concentración de nitrato (0,2, 0,4, 1, 2 y 10 mM) y que, cuando se indica, se incluyó $NADP^+$ a concentración final 1,1 mM en la mezcla de reacción.

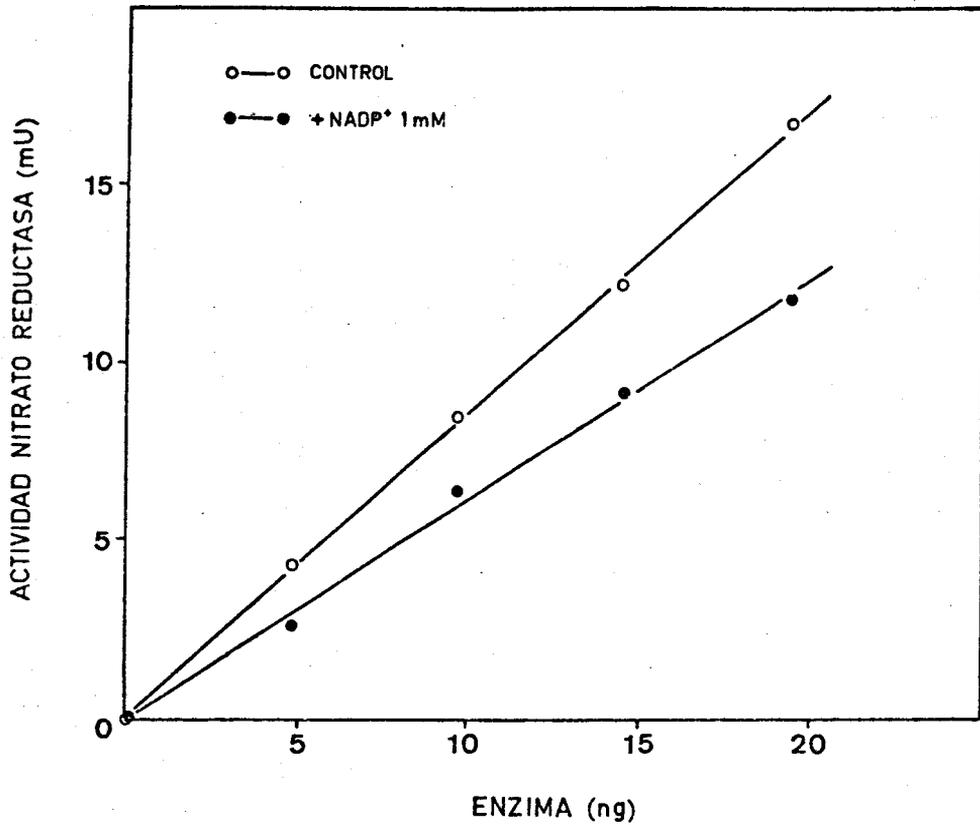


FIGURA 35. Efecto de la concentración de enzima sobre la velocidad de la reacción catalizada por la nitrato reductasa de *A. nidulans* en ausencia y presencia de $NADP^+$. Las condiciones fueron las del ensayo standard de actividad, excepto que cuando se indica se incluyó $NADP^+$ 1 mM en la mezcla de reacción.

IV. DISCUSSION

En la primera parte del trabajo realizado se aportan evidencias acerca de la participación de la ferredoxina como donador fisiológico de electrones para la nitrato reductasa de *Anacystis nidulans*, que sustentan y completan nuestras ideas previamente expuestas al respecto (Candau *et al.*, 1976; Manzano *et al.*, 1976; Manzano, 1977), contrapuestas a las de otros autores (Hattori y Myers, 1967; Hattori, 1970). Además de aclarar algunos aspectos relativos a la dependencia por ferredoxina de la reducción fotosintética del nitrato, se han puesto a punto dos nuevos sistemas para la reducción de ferredoxina, demostrándose que, independientemente del sistema reductor empleado, la ferredoxina reducida es capaz de donar electrones a la nitrato reductasa de *A. nidulans*. En este mismo contexto, se ha encontrado que la reducción de nitrato dependiente de piridín nucleótido reducido como donador de electrones, que tiene lugar en preparaciones poco purificadas de nitrato reductasa de cianobacterias, es debida a la presencia en ellas de ferredoxina endógena que, en este caso, desempeña el papel de transportador de electrones entre el piridín nucleótido y la nitrato reductasa.

Se ha actuado a tres niveles distintos para probar la intervención del flujo fotosintético de electrones en la reducción de nitrato en *A. nidulans* a través de la ferredoxina, proteína sulfoférica de bajo peso molecular (11 KD) que contiene 2 átomos de hierro no hemínico y un átomo de azufre lábil por molécula y presenta un potencial normal de -0,38 V a pH 7 (Yamanaka *et al.*, 1969; Smillie y Entsch, 1971). Por una parte se ha comprobado un efecto inhibitor del metilvioló

geno sobre la fotorreducción de nitrato, de igual extensión que el ejercido por este aceptor de electrones sobre otros sistemas cuya dependencia por ferredoxina reducida se encuentra bien demostrada, como son los de fotorreducción de NADP^+ (Forti, 1977) y de nitrito (Losada y Guerrero, 1979). Por otra parte, se han empleado compuestos que bloquean específicamente la reducción de ferredoxina por el fotosistema I, tales como el Sulfo-DSPD (Izawa, 1977), habiéndose comprobado su efecto inhibitorio sobre la fotorreducción de nitrato. Por último, se han ensayado compuestos tales como el NADP^+ que podrían competir con el nitrato por los electrones de la ferredoxina reducida y que, de hecho, disminuyen apreciablemente la velocidad de fotorreducción de nitrato en preparaciones de membranas de *A. nidulans*.

Aunque los tres sistemas citados interfieren con la reducción fotosintética de nitrato, sólo en el caso del metilviológeno los resultados tienen validez para poner de manifiesto la implicación de ferredoxina en el proceso, ya que las inhibiciones causadas por Sulfo-DSPD y NADP^+ pueden explicarse en parte por los efectos negativos que estos compuestos ejercen sobre la propia nitrato reductasa (apartado III.G.) como se discutirá posteriormente.

El requerimiento de ferredoxina que manifiesta la reducción fotosintética de nitrato en preparaciones de *Anacystis nidulans* con actividad de fotosistema I ya había sido indicado anteriormente por Manzano *et al.* (1976), si bien en ausencia de ferredoxina añadida se registraba una apreciable

producción de nitrito por estas preparaciones iluminadas. Esa velocidad residual de fotorreducción de nitrato fué atribuída a la presencia en las preparaciones de nitrato reductasa particulada de una pequeña cantidad de ferredoxina endógena. Nuestros resultados confirman esta hipótesis, ya que al lavar exhaustivamente las partículas fotosintéticas portadoras de la actividad nitrato reductasa, extrayendo de ellas la ferredoxina asociada, la dependencia por ferredoxina se manifiesta de forma más estricta.

La afinidad de la nitrato reductasa por su reductor fisiológico, ferredoxina, había sido estimada utilizando un sistema auxiliar de reducción compuesto por NADPH y una preparación parcialmente purificada de ferredoxina-NADP reductasa de hojas de espinaca (Manzano, 1977). La posible existencia de artefactos al emplear este sistema de reducción de ferredoxina, nos llevó a volver a estudiar este punto empleando un procedimiento más fisiológico, tal como la iluminación, en presencia de un donador adecuado de electrones, de partículas fotosintéticas lavadas de *A. nidulans*, que llevan asociada la nitrato reductasa y a las que se añadía ferredoxina altamente purificada del propio organismo. Los valores de K_m obtenidos con este sistema están en pleno acuerdo con los anteriormente citados (Manzano, 1977), quedando así establecido que la afinidad de la nitrato reductasa por la ferredoxina es lo suficientemente alta como para poder desempeñar el papel fisiológico de transportador de electrones en la reducción fotosintética de nitrato.

En condiciones de deficiencia de hierro en el medio de cultivo, las células de *Anacystis* sustituyen parcialmente la ferredoxina, proteína con un alto contenido en hierro, por flavodoxina (anteriormente denominada fitoflavina), una proteína de bajo peso molecular (20 KD) que presenta un potencial redox muy negativo (E'_0 , pH 7, -0,45 V) y que contiene FMN en su molécula, pero no hierro (Smillie y Entsch, 1971). Esta proteína se considera un sustituto de la ferredoxina en condiciones de deficiencia en hierro, y como tal se ha demostrado su participación como transportador de electrones en multitud de reacciones que usualmente dependen de ferredoxina (Bothe, 1977), a las que se ha unido, recientemente, la reducción fotosintética de nitrato en *A. nidulans* (Manzano, 1977).

Se ha estudiado la afinidad que presenta la nitrato reductasa por la flavodoxina, encontrando un valor de K_m tres veces más alto que el correspondiente a la ferredoxina, mientras que la velocidad máxima de fotorreducción de nitrato que se puede conseguir con ella es unas cinco veces inferior a la que se obtiene empleando ferredoxina. Pese a su menor eficiencia como transportador, se le puede considerar sustituto fisiológico de la ferredoxina en condiciones adversas de bajo contenido en hierro del medio, en las que otros muchos procesos metabólicos se encontrarían también limitados dada la amplia participación que el hierro tiene en multitud de enzimas entre los que en *A. nidulans* se incluyen la nitrito reductasa (Manzano, 1977), segundo enzima de la ruta de asimilación del nitrato y, aparentemente, la misma nitrato reductasa (aparta-

do III.F.).

Otro punto por aclarar era el de la posible obligatoriedad de la participación de la ferredoxina (o su sustituto, flavodoxina) como un intermediario en el paso de los electrones desde determinados reductores a la nitrato reductasa de cianobacterias. En efecto, se había descrito en *Anabaena cylindrica* la reducción de nitrato dependiente de NADH exclusivamente (Hattori y Myers, 1967), y nosotros mismos habíamos detectado actividad de reducción de nitrato en preparaciones de *A. nidulans* empleando NADH o NADPH como donador de electrones.

Sin embargo, cuando esas preparaciones poco purificadas se sometieron a cromatografía de intercambio iónico en condiciones en que la ferredoxina quedaba adsorbida a la matriz, desaparecía totalmente la capacidad del extracto para llevar a cabo la reducción de nitrato con NAD(P)H, a menos que se adicionase ferredoxina a la preparación enzimática (apartado III.A.3.). En consecuencia, el proceso que tendría lugar en esas preparaciones sería una reducción de ferredoxina presente en los extractos por NAD(P)H, a través de NADP reductasa u otro enzima con capacidad de transferir electrones del NAD(P)H a la ferredoxina, la cual posteriormente reduciría al nitrato en la reacción catalizada por la ferredoxina-nitrato reductasa. Seguimos pues manteniendo nuestra propuesta de que la ferredoxina es un requerimiento imprescindible para la reducción del nitrato en cianobacterias, y que la nitrato reductasa de estos organismos no puede aceptar electrones de piridín nucleótidos reducidos, a menos que la ferredoxina intervenga como transportador.

En base al demostrado papel de la ferredoxina como donador fisiológico inmediato de electrones, se propone para la nitrato reductasa de *A. nidulans* y, por extensión, para el enzima de otras cianobacterias y organismos procarióticos que coinciden con éste en lo que a la naturaleza del reductor fisiológico se refiere, el nombre sistemático de *ferredoxina:nitrato oxidorreductasa*, sin que la Comisión Internacional para Nomenclatura de Enzimas haya designado todavía nombre ni número de clasificación para nitrato reductasas de este tipo.

Una crítica que podía oponerse a la participación de la ferredoxina reducida como reductor directo para la reducción del nitrato en cianobacterias era la de su ineficiencia para actuar como donador cuando se le reducía químicamente con ditionito (Hattori y Myers, 1967; Manzano *et al.*, 1976). Revisando este problema, hemos encontrado que al reducir la ferredoxina con concentraciones bajas de ditionito, ésta se comporta como un donador de electrones de alta eficacia (mejor incluso que reducida por otros procedimientos, Tabla V) en la reducción del nitrato. La razón de su aparente ineficacia como transportador de electrones a concentraciones altas de ditionito viene dada, al parecer, por la gran afinidad que entre sí presentan la nitrato reductasa y la ferredoxina en estas condiciones, lo que provoca el establecimiento de un complejo $Fd_{red}/nitrato$ reductasa altamente estable que es inactivo para la reducción de nitrato. En apoyo de este hecho se ha encontrado que la pérdida de actividad nitrato reductasa con ferredoxina como transportador y ditionito como

reductor, es proporcional al logaritmo de la concentración de ditionito a partir de un cierto valor (Fig. 5), lo que indica una relación lineal entre la pérdida de actividad encontrada y el potencial redox de la mezcla de reacción.

La pérdida de actividad del enzima al aumentar la concentración de ditionito, ya había sido observada anteriormente (Manzano, 1977) si bien en este caso el ensayo se realizaba con metilviológeno y en condiciones aeróbicas. Igualmente, cuando a la mezcla de ensayo de la nitrato reductasa, con metilviológeno y ditionito, se añadía ferredoxina, tenía lugar una apreciable pérdida de actividad enzimática (Manzano, 1977). El mismo tipo de fenómeno ha sido recientemente observado en otro enzima de cianobacterias dependiente de ferredoxina, la nitrogenasa de *Anabaena cylindrica* (Hallenbeck *et al.*, 1979). Estos autores estudian el efecto de la concentración de ditionito sobre la reducción de acetileno, obteniendo unos resultados muy similares a los representados en la Figura 5. Igualmente describen una inhibición del 50% al añadir ferredoxina a una preparación de nitrogenasa que reducía acetileno, en presencia de ditionito.

Es interesante destacar que la inactivación aquí observada para la nitrato reductasa de *A. nidulans*, aparentemente relacionada con potenciales redox muy negativos, es totalmente reversible, ya que al establecer condiciones más oxidantes, por ejemplo reoxidando la ferredoxina por eliminación del ditionito, se disocia el complejo entre ferredoxina y nitrato reductasa, con recuperación de la actividad enzimática, como queda de manifiesto en los experimentos correspondientes

a la sección III.B., que se discuten más adelante.

Además de contribuir a la aclaración de los hechos anteriormente citados, el poder utilizar la ferredoxina reducida por bajas concentraciones de ditionito como sistema donador de electrones para la nitrato reductasa permite seguir el curso de la reacción registrando espectrofotométricamente la reoxidación, catalizada por la nitrato reductasa, de ferredoxina por nitrato a 420 nm, zona donde no interfiere ninguno de los componentes de la mezcla de reacción, lo que facilita extraordinariamente los estudios cinéticos del enzima. Empleando este procedimiento se ha determinado la estequiometría de la reacción, habiéndose obtenido un valor que demuestra la intervención de 2 moles de ferredoxina reducida por mol de nitrito producido (Tabla VI), en concordancia con el papel reconocido de transportador de un electrón para la ferredoxina, y con el requerimiento de dos electrones para la reducción del nitrato a nitrito.

El que la ferredoxina reducida con ditionito pueda actuar como sustrato donador de electrones para la nitrato reductasa de cianobacterias, permite también refutar la propuesta de requerimiento de un segundo cofactor sensible al ditionito, entre ferredoxina y nitrato reductasa, para posibilitar la transferencia de electrones entre estas proteínas (Hattori y Myers, 1967; Hattori, 1970) como justificación a la observación de que el sistema ferredoxina-ditionito era totalmente inefectivo como donador de electrones para la nitrato reductasa de *A. cylindrica*. Ahora podemos afirmar que la verdadera razón de la falta de operatividad observada era

la alta concentración de ditionito empleada por estos autores.

Además de la reducción química de la ferredoxina con ditionito, hemos puesto a punto un procedimiento fotoquímico de reducción de ferredoxina, empleando flavinas iluminadas, que permite, asimismo la reducción de nitrato catalizada por la nitrato reductasa.

La 5-deazarriboflavina, un derivado sintético de la riboflavina en el que el nitrógeno en posición 5 ha sido sustituido por un carbono (Hemmerich *et al.*, 1977), ha sido descrita como un sistema capaz de generar un potencial extraordinariamente negativo (-0,65 V) al ser iluminada en presencia de un reductor adecuado, habiéndose empleado para la reducción de diversas proteínas entre las que se encuentran ferredoxina de tipo bacteriano (Massey y Hemmerich, 1977), si bien hasta la fecha no tenemos noticias de su aplicación a la reducción de ninguna ferredoxina de algas ni de plantas superiores. Las flavinas y algunos de sus derivados naturales o sintéticos, pueden ser considerados como sistemas redox transductores de energía (Losada, 1979 a,b) en los que la forma oxidada (F1) es la especie fotorreceptora del par redox F1H/F1. Al ser éste un par de potencial redox bastante reductor (muy negativo), la flavina oxidada (F1) es difícilmente reducible en condiciones normales, pero sin embargo al absorber la luz se fotoexcita (F1*), creándose un nuevo par F1H/F1* cuyo potencial es mucho más positivo y que, por tanto, puede aceptar electrones de compuestos poco reductores. De esta manera, las flavinas iluminadas pueden bombear elec-

trones contra gradiente , transfiriéndolos desde sistemas donadores con potenciales muy oxidantes hasta aceptores de potenciales muy negativos. La Figura 36 esquematiza el sistema anteriormente descrito.

En nuestro caso hemos utilizado el sistema Tris/EDTA como donador y la ferredoxina como aceptor, de los electrones bombeados por la 5-deazarriboflavina iluminada. La ferredoxina puede reducirse de esta forma hasta niveles análogos a los conseguidos empleando ditionito, siendo la reducción completamente reversible (Fig. 6). Este parece ser el primer caso descrito de reducción por flavinas iluminadas de una ferredoxina del tipo de plantas, como es la ferredoxina de *Anacystis*.

La ferredoxina reducida de esta forma puede donar sus electrones a la nitrato reductasa de *A. nidulans* para la reducción del nitrato, independientemente de que el enzima se encuentre unido a sistemas de membranas fotosintéticas, o solubilizado y parcialmente purificado. Con estos sistemas se observa nuevamente que la reacción depende de ferredoxina para poder realizarse, requerimiento que es absoluto empleando enzima purificado y no tan estricto para preparaciones de membranas, en las que resulta lógica la existencia de pequeñas cantidades de ferredoxina endógena.

Este requerimiento de ferredoxina explica la aparente falta de operatividad descrita por Zumft *et al.* (1979) del sistema riboflavina iluminada/EDTA para la reducción de nitrato por la nitrato reductasa de *A. nidulans* . Este último sistema es, sin embargo, efectivo con nitrato reductasa de otros orga

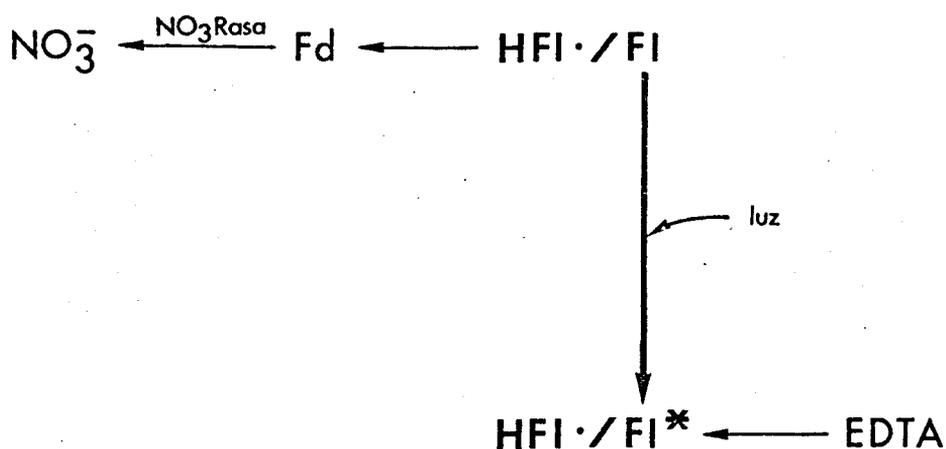


FIGURA 36. Representación esquemática del flujo de electrones mediado por la 5-deazarriboflavina iluminada desde el EDTA a la ferredoxina, y de ésta al nitrato por la nitrato reductasa de *A. nidulans*. La forma oxidada de la 5-deazarriboflavina en su estado basal (F1) se excita al absorber luz visible, actuándose (F1*). El par redox energizado (HF1·/F1*) presenta un potencial más positivo que en su estado basal (HF1·/F1), con el que comparte la misma forma reducida semiquinónica (HF1·), siendo capaz de aceptar electrones de compuestos de potencial muy positivo (EDTA). La forma semiquinónica así generada puede reducir a compuestos de potencial muy negativo como la ferredoxina de *A. nidulans*. La nitrato reductasa de *A. nidulans* cataliza la transferencia de electrones entre la ferredoxina reducida fotoquímicamente y el nitrato, reduciendo éste a nitrito.

nismos, tales como plantas superiores, algas verdes, hongos y bacterias denitrificantes (Zumft *et al.* 1979), enzimas que no dependen de ferredoxina. Tampoco la nitrato reductasa de *Azotobacter chroococcum*, bacteria quimiotrófica aeróbica, requiere ferredoxina para la reducción del nitrato en una reacción fotoquímica análoga, con FMN como sistema redox transductor (Llobel *et al.*, 1979). En cualquier caso, tanto la riboflavina como el FMN tienen baja eficiencia para la reducción fotoquímica del nitrato en el sistema de ferredoxina y nitrato reductasa de *A. nidulans*, siendo la efectividad de la 5-deazarriboflavina bastante superior a este respecto (Tabla XI). La base de este comportamiento diferencial puede residir en que tanto riboflavina como FMN fotorreducidos se comportan como donadores de dos electrones, mientras que las deazaflavinas iluminadas actúan como donadores de un electrón (Zumft *et al.*, 1979).

La cinética de la reacción de reducción de nitrato con el sistema de 5-deazarriboflavina, ferredoxina y nitrato reductasa de *A. nidulans* es lineal durante 15-20 min, si bien a partir de este punto la velocidad de la reacción decrece hasta hacerse cero a los 30 min aproximadamente (Fig. 8). La causa de la detención no es imputable al enzima, ya que se comprobó que éste seguía plenamente activo tras 60 min de iluminación del sistema, estabilidad que es normal en los distintos sistemas de ensayo que utilizan ferredoxina, a diferencia de lo que ocurre cuando se emplean transportadores artificiales como el metilviológeno (Manzano, 1977). Por otra parte, se registró un aumento de pH de aproximadamente una

unidad a lo largo de la reacción, lo que sugiere una destrucción del tampón Tris originada por oxidación del mismo por la flavina iluminada. Tanto el cambio de pH, como la generación de inhibidores de la nitrato reductasa a partir de algunos de los reactivos presentes en la mezcla, son posibles factores responsables de la detención de la reacción. Otra posible explicación es que la velocidad de reducción de la flavina fuese mayor que la capacidad de oxidación de la misma por el sistema ferredoxina/nitrato reductasa, con lo que se iría acumulando flavina reducida sin aceptor utilizable, con el consiguiente efecto de fotodestrucción de la flavina (apartado III.A.5.).

En cualquier caso, bien utilizando un sistema diferente del Tris, que no fuese capaz de donar electrones a la flavina, bien empleando cantidades inferiores de flavina o menor intensidad luminosa, es previsible la consecución de unas condiciones de ensayo que permitan al sistema fotoquímico operar durante periodos de tiempo más prolongados. Si tenemos en cuenta que el segundo enzima de la ruta de reducción de nitrato, la nitrito reductasa, también es dependiente de ferredoxina (Manzano *et al.*, 1976) podemos especular con la idea de un sistema semisintético compuesto por nitrato reductasa, nitrito reductasa y ferredoxina de algas verdes-azuladas, proteínas de gran estabilidad, que utilizando flavinas y luz de la zona visible del espectro llevase a cabo la reducción de nitrato a amonio, un compuesto de gran interés por su utilidad como fertilizante y como combustible de alto contenido energético (Losada, 1979 a,b; Losada y Guerrero, 1979). Un sistema

similar para la captación de energía luminosa en la producción de hidrógeno con hidrogenasa, ha sido desarrollado recientemente empleando flavinas iluminadas (Krashna, 1979).

La identificación de la ferredoxina reducida como sustrato fisiológico de la nitrato reductasa de *A. nidulans* y la alta afinidad que el enzima presenta por esta proteína, nos llevó a considerar la posibilidad de emplear ferredoxina unida a una matriz insoluble para purificar por cromatografía de afinidad la nitrato reductasa de esta cianobacteria. Se ha explotado con éxito el hecho, discutido anteriormente, de que a altas concentraciones de ditionito se establezca la formación de un complejo estable entre ferredoxina reducida y nitrato reductasa para unir, en condiciones reductoras, el enzima a la ferredoxina ligada a la matriz, eliminar la mayor parte de las proteínas contaminantes lavando con taponnes de fuerza iónica moderada y, finalmente, eluir la nitrato reductasa por reoxidación de la ferredoxina unida al gel (apartado III.B.). Este procedimiento de purificación, por sí mismo, aporta evidencias de que realmente se forma un complejo Fd_{red} /nitrato reductasa en condiciones de alta concentración de ditionito.

El gel de ferredoxina-Sefarosa en estado reducido tiene afinidad no sólo por la nitrato reductasa sino también por otros enzimas dependientes de ferredoxina, lo que se ha aprovechado para la purificación de la NADP reductasa de *A. nidulans*. En este caso, en vez de eluir reoxidando la ferredoxina, lo que implicaría también la elución de la nitrato reductasa, se ha aprovechado la acción del pirofosfato, inhibidor que compi-

te con la ferredoxina por el sitio activo de la NADP reductasa (Forti, 1971; Izawa, 1977), provocando la elución selectiva de este enzima. De esta forma se ha conseguido una purificación de 140 veces en un sólo paso para la NADP reductasa de *A. nidulans*.

Intentos preliminares que hemos llevado a cabo para purificar la nitrito reductasa de *A. nidulans* con el gel de Fd-Sefarosa reducido con ditionito no han tenido éxito, ya que el enzima no se une al gel a pesar de su reconocida afinidad por la ferredoxina como donador de electrones (Manzano *et al.*, 1976; Manzano, 1977). Este comportamiento anómalo es explicable teniendo en cuenta que el sulfito, uno de los productos resultantes de la oxidación del ditionito, es un inhibidor de las nitrito reductasas por el que el enzima presenta alta afinidad (Cárdenas *et al.*, 1979). Parece posible que utilizando un reductor distinto al ditionito para establecer las condiciones de reducción en que el gel de ferredoxina-Sefarosa tiene máxima efectividad, pueda lograrse con éxito la purificación de nitrito reductasas de organismos fotosintéticos.

Otros enzimas dependientes de ferredoxina han sido purificados empleando geles de ferredoxina-Sefarosa, tales como nitrito reductasa y glutamato sintasa de plantas superiores (Ida *et al.*, 1976; Wallsgrove y Mifflin, 1977), si bien en estos casos no se modificaba el estado de reducción de la ferredoxina y las eluciones se hacían de forma inespecífica mediante la aplicación de fuerza iónica.

Pensando en la posibilidad de que existiesen impedimentos del tipo estérico entre la matriz y la nitrato reductasa que dificultasen la unión de ésta a la ferredoxina, se empleó un brazo espaciador de seis carbonos de longitud para hacer más accesible la ferredoxina a la nitrato reductasa. En este caso, dado que se utilizó un resto aminohexil, la proteína se unía a los grupos aminos mediante sus grupos carboxilos quedando libres los grupos amino de la ferredoxina, al contrario de lo que ocurría al unirla a la matriz sin emplear cadena espaciadora. Como consecuencia de la abundancia de grupos carboxílicos existentes en la ferredoxina (Yamanaka *et al.*, 1969), se obtenía una mayor cantidad de proteína unida al gel, pero con el inconveniente de que la matriz quedaba ahora cargada positivamente comportándose como un intercambiador aniónico. Este parece ser el efecto aprovechado por Wallsgrove y Mifflin (1977) en su purificación de glutamato sintasa.

Los resultados obtenidos en la purificación de NADP reductasa y nitrato reductasa de *A. nidulans* (apartado III.B.) son buenos ejemplos de como el cambio en el estado redox del ligando (ferredoxina) modifica su afinidad por un enzima dado. La introducción de condiciones reductoras en la cromatografía de afinidad en gel de ferredoxina-Sefarosa aumenta las posibilidades de aplicación de este material para la purificación de enzimas dependientes de ferredoxina que no se unen a este gel en las condiciones hasta ahora descritas (Ida *et al.*, 1976; Wallsgrove y Mifflin, 1977). Es razonable pensar que modificaciones en el estado redox de otros materiales empleados en cromatografía de afinidad (tales como FAD-Sefarosa (Pan *et al.*,

1975) o flavodoxina-Sefarosa (Mayhew y Strating, 1975) pudieran también mejorar su eficiencia e incrementar el número de proteínas que pueden unirse a ellos. La alteración selectiva del estado redox de diferentes ligandos de los actualmente utilizados en la purificación de oxidorreductasas de distintos tipos posibilitaría sin duda ventajas notables en muchos casos.

Anteriormente se ha discutido la posible participación de la NADP reductasa en la transferencia de electrones desde el NADH a la nitrato reductasa, vía ferredoxina. Para determinar si ese cometido podía ser desempeñado por la NADP reductasa o si, por el contrario, debía asignarse a otro enzima con actividad NADH diaforásica, era conveniente purificar la proteína. Por otra parte, se conocían pocos detalles acerca del enzima de cianobacterias, lo que asimismo justificaba el intento de purificación.

El procedimiento utilizado en la purificación de la ferredoxina NADP reductasa de *A. nidulans* aprovecha la afinidad del enzima por los geles de ferredoxina/Sefarosa anteriormente citados, así como la similitud existente entre la estructura de los piridín nucleótidos y la del grupo cromóforo del azul dextrano (Thompson *et al.*, 1975). De esta manera se llevó a cabo una doble cromatografía de afinidad con especificidad de selección tanto por el aceptor como por el donador de electrones del enzima. Dado que la NADP reductasa acompañaba a la nitrato reductasa a lo largo de la purificación de esta última proteína, solo hubo que modificar ligeramente el paso de cromatografía de afinidad en geles de ferredoxina-Sefa-

rosa para obtener un enzima bastante purificado. La modificación consistía en eluir la NADP reductasa inespecíficamente con ClNa 0,15 M en lugar de con pirofosfato, más específico pero que dañaba a la nitrato reductasa aún adsorbida a la columna, imposibilitando su aprovechamiento posterior.

El efecto inhibitor del pirofosfato sobre la NADP reductasa se empleó, en este caso para eluir el enzima de *A. nidulans* de la columna de azul CL-6B-Sefarosa, obteniéndose una preparación que, tras una cromatografía en DEAE-Sephadex, resultaba homogénea.

La aparente presencia de dos formas de NADP reductasa, ambas activas (apartado III.C.) asemeja este enzima más a la NADP reductasa de hojas de espinaca (Forti, 1977), que a la de cianobacteria *Nostoc* estirpe MAC purificada recientemente (Hutber *et al.*, 1978).

La especificidad del enzima de *A. nidulans* por el NADPH es alta, si bien manifiesta una cierta actividad de reducción de ferredoxina con NADH que, aunque baja, podría ser suficiente para justificar la reducción de nitrato con NADH como donador de electrones detectada en extractos poco purificados de *A. nidulans* (apartado III.A.3.).

Al igual que ocurre con otras NADP reductasas (Böger, 1979), este enzima posee una actividad transhidrogenasa específica desde NADPH a NAD^+ (y no de NADH a NADP^+), y una actividad diaforásica desde NAD(P)H a diversos aceptores entre los que se cuentan DPIP, ferricianuro y oxígeno (apartado III.C.4.), por lo que se la puede incluir en el grupo de las

NADP reductasas del tipo plantas superiores. Por otra parte, el espectro de absorción del enzima de *A. nidulans* es bastante coincidente con el del enzima de hojas de espinaca (Shin *et al.*, 1963).

En la purificación de la nitrato reductasa descrita en este trabajo nos hemos encontrado con dos dificultades principales. Por una parte, el bajo contenido en nitrato reductasa, que presentan las células de este organismo y, por otra, la elevada cantidad de pigmentos existentes en las células de *Anacystis*.

Dada la alta velocidad de crecimiento con nitrato como fuente de nitrógeno de estas células era lógico suponer la existencia de una cantidad importante del enzima en los extractos celulares de *A. nidulans*. Sin embargo, la alta actividad específica de esta proteína y su pequeño tamaño molecular hacen que para la obtención de 1 mg de la proteína pura se requiera partir de unos 400 g de células.

Las ficocianinas, pigmentos auxiliares del fotosistema II, son proteínas que se encuentran en enorme cantidad en esta cianobacteria, llegando a constituir hasta el 50% de la proteína total de la célula (Fogg *et al.*, 1973). En los extractos celulares, las ficocianinas se encuentran en múltiples estados de agregación, desde el dímero al dodecámero. La eliminación de una de las formas mediante un paso de purificación apenas supone bajar un poco su contenido en la preparación, ya que inmediatamente se vuelve a originar a partir de las demás formas restableciéndose el equilibrio entre

ellas. La presencia de dos tipos de ficocianina, c-ficocianina y aloficocianina, con distintos pesos moleculares y estados de agregación, complica aún más su eliminación, al cubrir de forma casi continua un intervalo de peso molecular de 30 a 360 KD. Todas estas circunstancias hacen que la eliminación de estos pigmentos no sea tarea fácil, como se demuestra por ejemplo en el hecho de que preparaciones altamente purificadas (800 veces) de otro enzima de cianobacterias, la nitrito reductasa de *Nostoc muscorum*, presenten un espectro de absorción típico de ficocianina (Méndez, 1979).

El proceso de purificación empleado consta realmente de dos pasos principales, el fraccionamiento con etanol y la cromatografía de afinidad en geles de ferredoxina-Sefarosa, cuyo efecto combinado produce una purificación de más de 1.600 veces. Las otras tres etapas son fundamentalmente pasos de apoyo de los anteriores, con una purificación conjunta de sólo 6,3 veces.

La solubilización del enzima, firmemente anclado en las membranas fotosintéticas (Manzano, 1976), se llevó a cabo aprovechando la acción caotrópica de un sustrato del enzima, el nitrato, lo que probablemente protegía a la nitrito reductasa de la pérdida de actividad que se observaba al emplear otros agentes similares (apartado III.D.1.1.). El fraccionamiento con etanol eliminaba todos los fragmentos de membranas que no sedimentaban a $104.000 \times g$, conjuntamente con los ácidos nucleicos parcialmente degradados por las nucleasas y una gran cantidad de c-ficocianina, el pigmento más abundante,

con lo que se disminuía de 35 a 40 veces la cantidad de proteína presente en la preparación y, al mismo tiempo, se facilitaba la utilización de cromatografía en columna.

La cromatografía en geles de ferredoxina-Sefarosa iba precedida por un paso de intercambio iónico cuyo objetivo esencial consistía en eliminar la ferredoxina presente en los extractos para evitar que compitiere con la unida al gel, por la nitrato reductasa. El paso de afinidad purificaba casi 60 veces, rindiendo una preparación de nitrato reductasa pura en sus dos terceras partes, con contaminantes de fácil eliminación por filtración en gel. Los distintos tipos de purificación no parecen dañar apreciablemente al enzima, según se desprende de la constancia de la relación entre la actividad determinada con metilviológeno, donador artificial de bajo peso molecular, y la obtenida con ferredoxina como donador, en las que las interacciones con el enzima, proteína-proteína en este caso, han de ser mucho más delicadas, como se pone de manifiesto en su menor vida media (Tabla XV y Fig.27). La comparación de actividades se realizó tras aquellos pasos que representaban un peligro potencial para la integridad del enzima, como la solubilización con alta concentración de nitrato, el tratamiento con etanol, o la exposición prolongada a ditionito de la cromatografía de afinidad, no llevándose a cabo en aquellos otros de probada inocuidad.

En general, la recuperación de cada paso independientemente ha sido del orden del 75-80%, lo que ha permitido alcanzar, tras un proceso de cinco etapas, una purificación de

unas 10.000 veces con un rendimiento superior al 25%.

La preparación de nitrato reductasa de *A.nidulans* obtenida de esta forma era homogénea, según criterios electroforéticos y de constancia de actividad específica (apartado III.D.2.), y el enzima no parece estar muy alterado con respecto a su conformación *in vivo*, ya que la afinidad que muestra por el nitrato es la misma, tanto en células permeabilizadas ensayo *in situ*, como, en preparaciones homogéneas del enzima (Figs. 24 y 25).

La molécula es de pequeño tamaño en comparación con las de otras nitrato reductasas, con un radio de Stokes de sólo 32 Å y un coeficiente de sedimentación de 5,42 S. El coeficiente de fricción calculado (f/f_0) es igual a 1,15, lo que sugiere una forma ligeramente alargada.

El peso molecular del enzima ha sido estimado como 75 KD empleando los valores de radio de Stokes y coeficiente de sedimentación previamente calculados, así como por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, donde se encontraba una única banda de proteína, cuya movilidad relativa a los patrones correspondía a un peso molecular de 75 KD. Dado que el peso molecular estimado para la proteína nativa es igual al encontrado en condiciones desnaturalizantes, es forzoso concluir que la nitrato reductasa de *A. nidulans* está formada por una única cadena polipeptídica.

El punto de discontinuidad que se observa en la representación de Arrhenius (Fig. 26) indica la existencia de un cambio brusco de conformación del enzima al alcanzar los 26,2°C.

El efecto puede ser debido a la presencia en la molécula de nitrato reductasa de una porción lipídica que sufriese un cambio de fase a esa temperatura, como ocurre con otras proteínas (Ceuterick *et al.*, 1977). Es interesante señalar que la nitrato reductasa de *A. nidulans* es una molécula relativamente cargada, como se demuestra en la interacción que sufre con la DEAE-celulosa, y que está firmemente unida a membranas fotosintéticas (Manzano *et al.*, 1976). No sería pues extraño que esta proteína hidrofílica se anclase a la membrana hidrófoba mediante una porción lipídica. En *Anacystis nidulans* se ha observado una discontinuidad a 24°C en la representación de Arrhenius del desprendimiento fotosintético de oxígeno, originado por un cambio en los lípidos de la membrana, del estado de cristal líquido al de separación de fases (Murata *et al.*, 1975; Murata y Fork, 1978). Los valores de energías de activación encontradas tanto en este caso, 34 y 19 Kcal/mol, como en el de la nitrato reductasa, 27,4 y 12,6 Kcal/mol, disminuyen marcadamente al superarse la temperatura de transición.

Se ha intentado estudiar el efecto de los detergentes sobre la temperatura de transición de la nitrato reductasa utilizando los procedimientos empleados por Ceuterick *et al.* (1977) con la nitrogenasa de *Azotobacter chroococcum*, pero las concentraciones de detergentes necesarios para provocar el cambio de fase del posible lípido provocaban la pérdida de la actividad nitrato reductasa.

La presencia de una porción lipídica en la proteína explicaría también el comportamiento anómalo observado en fil

tración en gel de AcA 44, donde la molécula se conduce como si tuviese un peso molecular inferior al calculado en función del radio de Stokes y el coeficiente de sedimentación (68,4 KD en lugar de 75 KD), justamente lo contrario de lo que cabría esperar de una molécula asimétrica. Una explicación posible de ese efecto sería la existencia de interacciones hidrofóbicas entre el lípido de la proteína y la acrilamida del gel, originando un retraso en la elución del enzima que conduce a una evaluación por defecto del peso molecular.

Las dificultades anteriormente aludidas para conseguir las cantidades importantes de proteína que requeriría un estudio directo por análisis cualitativo y cuantitativo de los grupos prostéticos del enzima, han originado la limitación del abordaje de este punto en base a procedimientos indirectos.

Como ya se ha comentado en el apartado III.E.2.1., el espectro de absorción diferencial, oxidado menos reducido, de la nitrato reductasa de *A. nidulans*, indicaba la ausencia de grupos flavínicos o hemínicos en el enzima, grupos que serían muy evidentes en las condiciones de concentración de enzima y sensibilidad de detección empleados, por lo que puede concluirse la ausencia de estos grupos prostéticos de la nitrato reductasa de *A. nidulans*.

La participación del molibdeno en la actividad catalítica del enzima ha sido puesta de manifiesto mediante experimentos de competencia de molibdeno con su análogo estructural

volframio realizados tanto extrayendo el enzima de la célula como llevando a cabo la medida de actividad *in situ*. Para otras nitrato reductasas se ha demostrado que el volframio ocupa el lugar del molibdeno en la molécula, originándose una proteína sin actividad catalítica (Losada y Guerrero, 1979). La nitrato reductasa de *A.nidulans* posee una afinidad mucho más alta por el molibdeno que por el volframio, ya que al añadir molibdato a células que tienen nitrato reductasa no funcional por acción de este elemento, se recupera la actividad de forma prácticamente total aún en presencia de concentraciones de volframio diez veces superiores a la de molibdato añadido (Fig. 31).

La acción de diversos reactivos de hierro sobre la nitrato reductasa sugiere la participación de este metal en el enzima. Dado que estos compuestos no son absolutamente específicos de hierro podría pensarse que pudiesen afectar al molibdeno del enzima, si bien algunos de estos reactivos han sido ensayados, a concentraciones superiores a las empleadas por nosotros, sobre nitrato reductasas de eucariotas que también poseen molibdeno en su molécula, sin que se afecte su actividad con metilviológeno (Garrett y Nason, 1969; Pan y Nason, 1978). Por otra parte, la mayor efectividad de la preincubación con ferrozina en condiciones reductoras apoya la existencia de hierro, ya que es el hierro II la especie iónica con la que se acompleja este compuesto (Stookey, 1970; Kundra *et al.*, 1974). El cobre I también puede formar un quelato bidentado con la ferrozina, uniéndose dos moléculas de inhibidor por átomo de cobre en lugar de tres por átomo como ocurre en

el caso del hierro (Kundra *et al.*, 1979). Sin embargo, la relación lineal existente entre inhibición y el cubo de la concentración de ferrozina (Fig. 32), sugiere la participación conjunta de tres moléculas de inhibidor, y consecuentemente apoya la presencia de hierro no hemínico en la molécula de nitrato reductasa de *A. nidulans*.

La acción que el sulfo-DSPD ejerce en la fotorreducción de nitrato se ha comprobado que tiene lugar sobre la nitrato reductasa, probablemente debido a la capacidad quelante de metales de este compuesto (Izawa, 1977), al igual que ocurría con la nitrato reductasa de *Chlorella pyrenoidosa* (Trebst y Burba, 1967).

La acción de ferricianuro sobre el enzima puede interpretarse como una evidencia de la participación de molibdeno en la nitrato reductasa, ya que está descrita la acción de este compuesto como agente causante de pérdida de molibdeno en el enzima sulfito oxidasa (Kessler y Rajagopalan, 1974), otra molibdo proteína, sobre la que causa una inactivación muy similar a la producida sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*. Sin embargo, el efecto protector del ferricianuro a bajas concentraciones (Tabla XXI) sugiere la posibilidad de que una oxidación de grupos de la proteína sea la consecuencia de la preincubación del enzima con ferricianuro. La nitrato reductasa de *A. nidulans* es muy sensible a reactivos de grupos sulfhidrilos tales como el p-hidroximercuribenzoato (Manzano *et al.*, 1976), por lo que se puede suponer que la integridad de estos grupos resulta imprescindible para la actividad catalítica del enzima. La acción del ferricia

nuro como oxidante de grupos sulfhidrilos ha sido descrita en otros enzimas (Webb , 1966), por lo que es posible que sea ésta, al menos en parte, la razón de su efecto sobre la nitrato reductasa, si bien no se ha logrado reversión de la inactivación empleando reactivos que como el DTE reducen grupos sulfhidrilos.

La Tabla XXVI compara resumidamente algunas propiedades de la nitrato reductasa de *A. nidulans* con los enzimas de otros organismos. En general, los enzimas de organismos eucarióticos son de mayor tamaño, contienen FAD y hemo b en su molécula y utilizan los piridín nucleótidos reducidos como donadores directos de electrones, encontrándose en estado soluble (Losada y Guerrero, 1979). Por el contrario, tanto el enzima de *A. nidulans* como el de *R. capsulata*, únicos purificados hasta homogeneidad de procariotas fotosintéticos (cianobacterias y bacterias fotosintéticas respectivamente), están unidos a membranas fotosintéticas, no contienen FAD y no aceptan electrones de los piridín nucleótidos, sin que hasta el momento esté indentificado el donador fisiológico de electrones para el enzima de *R. capsulata*. El molibdeno parece ser común en todas las nitrato reductasas estudiadas. Como se puede observar, las actividades específicas varían grandemente de un enzima a otro. El número de recambio para el enzima de *A. nidulans* , 69.000 min^{-1} , es similar al de la nitrato reductasa de algas eucarióticas.

Ciertamente existen diferencias antigénicas notables entre el enzima de *Anacystis* y el de organismos eucarióticos,

TABLA XXVI

COMPARACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE *Anacystis nidulans* CON OTRAS PURIFICADAS A HOMOGENEIDAD

Organismos	Donador de electrones	Localización celular	Peso molecular (KD)	Subunidades	Grupos prostéticos			Actividad específica MV-nitrato reductasa (U/mg)
					FAD	Fe	Mo	
<i>Chlorella vulgaris</i> ^a (alga verde)	NADH	soluble	356	3 x 95 KD	2	2 hemo b	2	190
<i>Neurospora crassa</i> ^{b,c} (hongo)	NAD(P)H	soluble	228	115 + 130 KD	2	2 hemo b	1	5
<i>Rhodospseudomonas capsulata</i> ^d (bacteria fotosintética)	¿Fd?	cromatóforos	185	2 x 85 KD	-	1-2 hemo c	1	1
<i>Anacystis nidulans</i> ^e (cianobacteria)	Fd	tilacoides	75	1 x 75 KD	-	¿{Fe-S}?	+	867

^aSolomonson *et al.* (1975); ^bGarrett y Nason (1969); ^cPan y Nason (1978); ^dAlef y Klemme (1979); ^eEste trabajo.

ya que una preparación de suero antinitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*, que inhibía fuertemente la actividad de este enzima, así como del de las nitrato reductasas de espinacas, *Ankistrodesmus braunii* y *Rhodotorula glutinis* (datos no incluidos en Resultados), no tenía efecto alguno sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans*.

El efecto inhibitor del NADP^+ sobre la nitrato reductasa de *A. nidulans* (apartado III.G.3) podría tener implicaciones de tipo regulatorio, limitando la reducción de nitrato en condiciones de alta concentración de NADP^+ en las que el escaso poder reductor presente en las células deba ser empleado preferentemente para otros fines. El nivel de NADP^+ en células de *Anacystis* creciendo a la luz es del orden de 0,1 mM, haciéndose unas 4 veces superior en la oscuridad (Peschek, 1979).

El valor de K_i calculado para el NADP^+ , 2 mM, parece demasiado alto para que este compuesto, a concentraciones entre 0,1 y 0,4 mM, pudiera ejercer algún control efectivo sobre la reducción del nitrato. No pueden excluirse, sin embargo, las posibilidades de que la afinidad del NADP^+ por la nitrato reductasa *in vivo* fuese superior, o de que exista un efecto potenciador de la inhibición por NADP^+ , aún no conocido, o de que se produzcan acumulaciones locales de NADP^+ en los puntos concretos de reducción de nitrato que elevasen su concentración desde 0,4 mM, promedio de la célula, hasta niveles superiores.

V. CONCLUSIONES

- 1^a La nitrato reductasa de la cianobacteria *Anacystis nidulans* utiliza como donador fisiológico de electrones la forma reducida de la ferredoxina.

La reducción *in vitro* de esta proteína, químicamente con ditionito o fotoquímicamente mediante flavinas iluminadas es efectiva para su acoplamiento con la reacción de reducción de nitrato catalizada por esta ferredoxina-nitrato oxidoreductasa.

La flavodoxina, una flavoproteína de potencial redox similar a la ferredoxina, puede sustituir a ésta en su función de transportador de electrones para la reducción de nitrato en *Anacystis nidulans*.

- 2^a La fotorreducción de nitrato a nitrito con nitrato reductasa y ferredoxina de *Anacystis nidulans* empleando 5-deazarriboflavina como transductor de energía constituye un ejemplo de conversión de energía luminosa en energía química, en un sistema semisintético con compuestos químicos y biológicos. Estos resultados sientan las bases para posibles aplicaciones de sistemas de este tipo a la fotoproducción de amoníaco y otros compuestos de interés energético.

- 3^a El empleo adecuado de geles de ferredoxina-Sefarosa constituye un paso clave para la purificación, con gran rapidez y efectividad, de enzimas dependientes de ferredoxina, según se ha demostrado aquí en la purificación de NADP reduc

tasa y nitrato reductasa de *Anacystis nidulans*.

El aprovechamiento de la diferente afinidad de las proteínas por las formas oxidada y reducida del ligando, representa una ampliación de las posibilidades de la cromatografía de afinidad para la purificación de oxidorreductasas.

4^a La ferredoxina-nitrato reductasa de *Anacystis nidulans* es una proteína compuesta de una sola cadena polipeptídica de peso molecular 75.000 D, que no contiene grupos prostéticos hemínicos o flavínicos, diferenciándose notablemente del correspondiente enzima de otros organismos.

5^a Los efectos negativos que sobre la actividad enzimática presenta el wolframio, *in vivo*, e inhibidores específicos, *in vitro*, indica la participación, en la actividad catalítica de la ferredoxina-nitrato reductasa de *Anacystis nidulans*, de molibdeno e hierro no hemínico.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Alef, K. y Klemme, J.H. (1977) *Z. Naturforsch.* 32c, 954-956.
- Alef, K. y Klemme, J.H. (1979) *Z. Naturforsch.* 34c, 33-37.
- Allen, M.M. (1968) *J. Phycol.* 4, 1-4.
- Allen, M.B. y Arnon, D.I. (1955) *Plant Physiol.* 30, 366-372.
- Andrews, P. (1964) *Biochem. J.* 91, 222-233.
- Arnon, D.I. (1949) *Plant Physiol.* 24, 1-15.
- Arnon, D.I., McSwain, B.D., Tsujimoto, H.Y. y Wada, K. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 357, 231-245.
- Bailey, J.L. (1967) *Techniques in Protein Chemistry*, 2^a edición, p. 340, Elsevier, Amsterdam.
- Beevers, L. y Hageman, R.H. (1969) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 20, 495-522.
- Beevers, L. y Hageman, R.H. (1972) en *Photophysiology* (A.C. Giese, ed.), Vol. 7, pp. 85-113, Academic Press, New York.
- Bergmeyer, H.U. (1974) *Methoden der Enzymatischen Analyse*, 3^a edición, Vol. 1, Verlag Chemie, Weinheim.
- Böger, P. (1979) en *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 6, pp. 399-409, Springer Verlag, Berlin.
- Bothe, H. (1977) en *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 5, pp. 217-221, Springer Verlag, Berlin.
- Brewer, J.M., Pesce, A.J. y Ashworth, R.B. (1974) *Experimental Techniques in Biochemistry*, Prentice-Hall, New Jersey
- Candau, P., Manzano, C. y Guerrero, M.G. (1977) VII Congreso Sociedad Española Bioquímica. Pamplona. Resúmenes 4.
- Candau, P., Manzano, C. y Guerrero, M.G. (1979a) VIII Congreso Sociedad Española Bioquímica. Murcia. Resúmenes 92.
- Candau, P., Manzano, C. y Guerrero, M.G. (1979b) VIII Congreso Sociedad Española Bioquímica. Murcia. Resúmenes 152.
- Candau, P., Manzano, C. y Guerrero, M.G. (1979c) VIII Congreso Sociedad Española Bioquímica. Murcia. Resúmenes 154.
- Candau, P., Manzano, C. Losada, M. (1976) *Nature* 262, 715-717.
- Cárdenas, J., Vega, J.M. y Losada, M. (1979) *Methods Enzymol.* (en prensa).
- Ceuterick, F., Peeters, J., Heremans, K., De Smedt, H. y Olbrechts, H. (1977) *Eur. J. Biochem.* 87, 401-407.

- Cerletti, P. y Caiafa, P. (1971) *Methods Enzymol.* 18B, 399-403.
- Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P. y Walsby, A.E. (1973) en *The Blue-Green Algae*, Academic Press, London y New York.
- Forti, G. (1977) en *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 5, pp. 222-226, Springer Verlag, Berlin.
- Garrett, R.H. y Nason, A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2870-2882.
- Hall, D.O., Rao, K.K. y Cammack, R. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47, 798-802.
- Hallenbeck, P.C., Kostel, P.J. y Benemann, J.R. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98, 275-284 (1979).
- Hattori, A. (1970) *Plant Cell Physiol.* 11, 975-978.
- Hattori, A. y Myers, J. (1966) *Plant Physiology* 41, 1031-1036.
- Hattori, A. y Myers, J. (1967) *Plant Cell Physiol.* 8, 327-337.
- Hattori, A. y Uesugi, I. (1968a) *Plant Cell Physiol.* 9, 689-699.
- Hattori, A. y Uesugi, I. (1968b) en *Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis* (K. Shibata, A. Takamika, A.T. Jagendorf y R.C. Fuller, eds.), pp. 201-205, University of Tokyo Press, University Park Press, State College, Pennsylvania.
- Hemmerich, P., Massey, V. y Fenner, H. (1977) *FEBS Lett.* 84, 5-21.
- Hewitt, E.J. (1975) *Ann. Rev. Plant Physiol.* 26, 73-100.
- Hewitt, E.J., Hucklesby, D.P. y Notton, B.A. (1976) en *Plant Biochemistry* (J. Bonner y J.E. Varner, eds.) 3ª edición, pp. 663-681, Academic Press, New York.
- Hucklesby, D.P. y Hageman, R.H. (1973) *Anal. Biochem.* 56, 591-592.
- Hutber, G.N., Smiter, A.J. y Rogers, L.J. (1978) *Biochem. Soc. Transactions* 6, 1214-1216.
- Ida, S., Kobayakawa, K. y Morita, Y. (1976) *FEBS Lett.* 65, 305-308.
- Izawa, S. (1977) en *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 5, pp. 266-282, Springer Verlag, Berlin.
- Kato, T. (1963) *Plant Cell Physiol.* 4, 199-215.

- Kessler, D.L. y Rajagopalan, K.V. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* 370, 399-409.
- Krashna, A.I. (1979) *Photochem. Photobiol.* 29, 267-276.
- Kundra, S.K., Katyal, M. y Singh, R.P. (1974) *Anal. Chem.* 46, 1605-1606.
- Lancaster, J.C., Vega, J.M., Kamin, H., Orme-Johnson, N.R., Orme-Johnson, W.H., Krueger, R.J. y Siegel, L.M. (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 1268-1272.
- Laurent, T.C. y Killander, J. (1964) *J. Chromatogr.* 14, 317-330.
- Llobel, A., Bárcena, J.A., Vila, R. y Paneque, A. (1979) *Z. Pflanzanphysiol.* (enviado para publicación).
- Lorentz, K. (1976) *Anal. Biochem.* 76, 214-220.
- Losada, M. (1972) Discurso de Ingreso, Real Academia Ciencias, Madrid.
- Losada, M. (1976) *J. Mol. Catal.* 1, 245-264.
- Losada, M. (1979a) Discurso de Ingreso, Real Academia de Medicina, Sevilla.
- Losada, M. (1979b) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6, 205-225.
- Losada, M. y Guerrero, M.G. (1979) en *Topics in Photosynthesis* (J. Barber, ed.), Vol. 3, Elsevier, Amsterdam, pp. 365-408.
- Lowry, O.H., Rosebrough, M.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Manzano, C. (1977) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Manzano, C., Candau, P., Gómez-Moreno, C., Relimpio, A.M. y Losada, M. (1976) *Mol. Cell. Biochem.* 10, 161-169.
- Manzano, C., Candau, P. y Guerrero, M.G. (1978) XVII Reunión Sociedad Española Bioquímica. Madrid. Resúmenes 63.
- Manzano, C., Candau, P. y Guerrero, M.G. (1978) *Anal. Biochem.* 90, 408-412.
- Martin, R.G. y Ames, B.N. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 1372-1379.
- Massey, V. y Hemmerich, P. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 5612-5614.
- Maurer, H.R. (1971) *Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (W. de Gruyter, ed.), Berlin, New York.

- Mayhew, S.G. y Strating, J.J. (1975) *Eur. J. Biochem.* 59, 539-544.
- Medina, A. y Nicholas, D.J.D. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* 23, 440-442.
- Méndez, J.M. (1979) Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla.
- Murata, N. y Fork, D.C. (1978) Carnegie Institution, Annual Report (1977-1978) of the Director Department of Plant Physiology, pp. 289-291.
- Murata, N., Troughton, J.H. y Fork, D.C. (1975) *Plant Physiol.* 56, 508-517.
- Ortega, T., Castillo, F. y Cárdenas, J. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 885-891.
- Pan, S.S., Erickson, R.H. y Nason, A. (1975) *Fed. Proc.* 34, 682.
- Pan, S.S. y Nason, A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 523, 297-313.
- Peschek, G.A. (1979) *FEBS Lett.* 106, 34-38.
- P.L. Biochemicals (1973) *Ultraviolet absorption spectra of pyridine nucleotide coenzymes and coenzyme analogs*, Circular OR-18, 6^a edición.
- Schopf, J.W. (1970) *J. Palaentol.* 44, 1.
- Segel, I.H. (1975) *Enzyme Kinetics*, Wiley-Interscience, New York.
- Shin, M. (1971) *Methods Enzymol.* 23, 440-447.
- Shin, M., Tagawa, K. y Arnon, D.I. (1963) *Biochem. Z.* 338, 84-96 (1963).
- Siegel, L.M. y Monty, K.J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 112, 346-362.
- Smillie, R.M. y Entsch, B. (1971) *Methods Enzymol.* 23A, 504-514.
- Snell, F.D. y Snell, C.T. (1949) *Colorimetric Methods of Analysis*, Vol. 3, pp. 804-805, Van Nostrand Co. Inc., New York.
- Solomonson, L.P., Lorimer, G.H., Hall, R.L., Borchers, R. y Bailey, J.L. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4120-4127.
- Stanier, R.Y. y Cohen-Bazire, G. (1977) *Ann. Rev. Microbiol.* 31, 225-274 (1977).
- Stookey, L.L (1970) *Anal. Chem.* 42, 779-781.

Thompson, S.T., Cass, K.H. y Stellwagen, E. (1975) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72, 669-672.

Trebst, A. y Burba, M. (1967) Z. Pflanzenphysiol. 57, 419-433.

Vennesland, B. y Guerrero, M.G. (1979) en *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Vol. 6, pp. 425-444 (1979).

Wallsgrave, R.M. y Mifflin, B.J. (1977) Biochem Soc. Trans. 5, 269-271.

Warburg, O. y Christian, W. Biochem. Z. 310, 384.

Webb, J.L. (1966) *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, Vol. II, pp. 670-678, Academic Press, New York.

Weber, K. y Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.

Weber, K. y Osborn, M. (1975) en *The Proteins*, 3^a edición, (H. Neurath, R.L. Hill y C.L. Boeder, eds.) Vol. 1, pp. 179-223, Academic Press, New York y London.

Yamanaka, T., Takenami, S., Wada, K. y Okunuki, K. (1969) Biochim. Biophys. Acta 180, 196-198.

Yonetani, T. (1965) J. Biol. Chem. 240, 4509.

Zumft, W.G., Castillo, F. y Hartmann, K.H. (1979) International Conference on the Effect of Blue Light in Plant and Microorganisms. Marburg, Abstracts pp. 76-77.



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Reunido el Tribunal por los abajo firmantes
en el día de la fecha para otorgar la Tesis Doctoral de

D. Pedro Caudan Chacón
titulada "Purificación y propiedades de la Ferro-
doxina-nitrato reductasa de la cyanobacteria
Anacystis nidulans".

Se acordó otorgarle la calificación de _____

Sevilla, _____ de _____ 19____

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

[Signature]

[Signature]

[Signature]

El Presidente,

El Secretario

El Doctor

[Signature]

[Signature]

Pedro Caudan Chacón



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672582

FBI E TO-021

292079