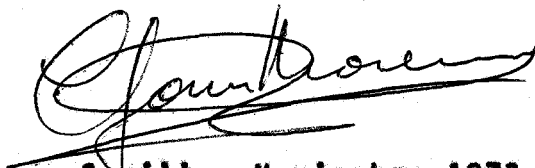


TD/498

**INTERCONVERSION ENTRE UNA FORMA OXIDADA Y ACTIVA  
DE LA NITRATO REDUCTASA Y OTRA REDUCIDA E INACTIVA**

*Seccion de Biologicas*

**Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias  
por el Licenciado D. CARLOS GOMEZ-MORENO CALERA**



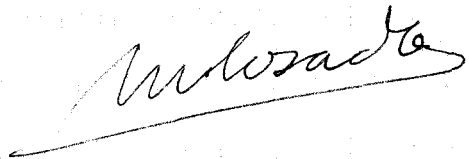
**Sevilla, Noviembre 1973**

**DIRECTOR**



**Dr. Enrique Palacián Gil  
Investigador del C.S.I.C.**

**PONENTE**



**Prof. Manuel Losada Villasante  
Catedrático de Bioquímica**

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

SECRETARIA DE CIENCIAS

14-11-73

LIBRO N.º 473



P 18.593

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

**A mis padres**

[Faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the page]

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección del Dr. Enrique Palacián Gil.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Prof. M. Losada Villasante y al Dr. E. Palacián Gil, quienes con su entusiasmo y constante dedicación han logrado inculcarme su interés por la Ciencia, así como por sus útiles enseñanzas que han hecho posible la realización de esta tesis.

Al Prof. A. Paneque Guerrero le agradezco su interés y colaboración, así como su valiosa crítica.

Mi agradecimiento así mismo, al Prof. M. Ruiz-Amil y a la Dra. E. Fernández Fernández, quienes con gran paciencia consiguieron iniciarme en las tareas investigadoras.

A los doctores P.J. Aparicio, J. Cárdenas, J.M. Vega, J. Herrera, M. García Guerrero y J. Rivas; a mis compañeros J. López Barea y J.M. Maldonado Ruiz y especialmente a F.F. de la Rosa, F. Castillo y J.M. Roldán por su eficacísima ayuda. Mi sincera gratitud a las Srtas. I. Fernández, M<sup>a</sup>. J. Pérez de León y A. Jiménez, así como a

**D. J. Moreno por su ayuda en la realización y composición de esta tesis.**

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

INDICE

Abreviaturas ..... 10

I. INTRODUCCION ..... 12

II. MATERIALES Y METODOS ..... 37

    1. MATERIALES BIOLÓGICOS UTILIZADOS, OBTENCION DE  
EXTRACTOS Y PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTA-  
SA ..... 38

        1.1. Chlorella fusca ..... 38

        1.2. Spinacea oleracea ..... 41

    2. METODOS ANALITICOS ..... 44

        2.1. Determinación de protefna ..... 44

        2.2. Ensayos enzimáticos ..... 44

        2.3. Valoración de la cisteina ..... 46

        2.4. Determinaciones espectrofotométricas y fluo-  
rimétricas ..... 47

    3. REACTIVOS Y APARATOS ..... 48

        3.1. Preparación del gel de fosfato cálcico ... 48

        3.2. Procedencia de los productos químicos .... 48

        3.3. Aparatos ..... 49

<b>III. RESULTADOS</b> .....	51
<b>1. PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>Chlorella fusca</u></b> .....	52
<b>2. INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>Chlorella fusca</u> POR REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILLO</b> .....	58
<b>2.1. <u>Inactivación reversible por p-hidroximercuri-benzoato</u></b> .....	58
<b>2.1.1. Efecto del pMB sobre las distintas actividades del complejo enzimático</b> ...	58
<b>2.1.2. Reactivación por DTE del enzima inactivado por pMB</b> .....	58
<b>2.2. <u>Inactivación por N-etil-maleimida</u></b> .....	61
<b>2.2.1. Efecto de la NEM sobre las distintas actividades del complejo enzimático</b> .	61
<b>2.2.2. Protección por NADH de la inactivación por NEM</b> .....	61
<b>3. INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE <u>Chlorella fusca</u> POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS</b> .....	64
<b>3.1. <u>Inactivación de la nitrato reductasa por NADH y NADPH</u></b> .....	64

3.1.1. Efecto del NADH y NADPH sobre las tres actividades del complejo enzimático ...	64
3.1.2. Efecto de distintas concentraciones de piridín nucleótido reducido sobre la inactivación .....	67
3.1.3. Efecto del pH en la inactivación por NADH .....	67
3.1.4. Efecto del NADH sobre la nitrato reductasa modificada por PNB .....	71
<b>3.2. <u>Protección de la nitrato reductasa frente a la inactivación por piridín nucleótidos reducidos</u></b> .....	<b>74</b>
3.2.1. Protección por nitrato .....	74
3.2.2. Protección por NADP <sup>+</sup> .....	74
3.2.3. Protección por NADP <sup>+</sup> de la inactivación producida por NADH más cianuro ...	82
3.2.4. Protección por otros compuestos fosforilados .....	82
<b>3.3. <u>Reactivación de la nitrato reductasa inactivada por piridín nucleótidos reducidos</u></b> .....	<b>85</b>
3.3.1. Reactivación espontánea .....	85
3.3.2. Reactivación durante el ensayo de la	



*actividad* ..... 85

**3.3.3. Reactivación por ferricitanuro** ..... 86

**4. INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca Y Spinacea oleracea POR TIOLLES** ..... 90

**4.1. Inactivación de la nitrato reductasa por tioles** ..... 90

4.1.1. *Efecto de los tioles sobre las tres actividades del complejo enzimático.* ..... 90

4.1.2. *Efecto de distintas concentraciones de DTE sobre la inactivación* ..... 92

4.1.3. *Efecto del pH en la inactivación por DTE* ..... 95

4.1.4. *Efecto del NAD<sup>+</sup> en la inactivación por DTE* ..... 99

4.1.5. *Inactivación por DTE y por DTE más NAD<sup>+</sup> de una preparación de nitrato reductasa desprovista de actividad NADH-díforasa* ..... 105

**4.2. Protección de la nitrato reductasa frente a la inactivación por tioles.** ..... 108

4.2.1. <i>Protección por nitrato</i> .....	108
4.3. <u>Reactivación de la nitrato reductasa inactivada por tioles</u> .....	111
4.3.1. <i>Reactivación espontánea</i> .....	111
4.3.2. <i>Reactivación por ferrocianuro</i> .....	111
4.3.3. <i>Reactivación por otros agentes</i> .....	112
5. <u>INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE <i>Chlorella fusca</i> POR SULFITO</u> .....	113
5.1. <u>Inactivación de la nitrato reductasa por sulfito</u> .....	113
5.1.1. <i>Efecto del sulfito sobre las tres actividades del complejo enzimático</i> .....	113
5.1.2. <i>Efecto del NAD<sup>+</sup> en la inactivación por sulfito</i> .....	116
5.2. <u>Protección de la nitrato reductasa frente a la inactivación por sulfito</u> .....	116
5.2.1. <i>Protección por nitrato</i> .....	116
5.3. <u>Reactivación de la nitrato reductasa inactivada por sulfito</u> .....	116
5.3.1. <i>Reactivación por ferrocianuro</i> .....	116
IV. <u>DISCUSION</u> .....	119
V. <u>CONCLUSIONES</u> .....	134
VI. <u>BIBLIOGRAFIA</u> .....	139

Abreviaturas

- ADP .....difosfato de adenosina
- AMP .....monofosfato de adenosina
- ATP .....trifosfato de adenosina
- CoA .....Coenzima A
- DEMU.....3-(3',4' clidlorofenil)-1,1 dimetil urea
- DEAE-Sephadex .....N,N-dietil amino etil Sephadex
- DTE .....2,3-dihidroxi-1,4-ditiol butano (ditioeritritol).
- FAD .....flavín adenín dinucleótido
- FMN .....flavín mononucleótido
- FNH<sub>2</sub> .....flavín nucleótidos reducidos
- g .....aceleración de la gravedad
- NAD<sup>+</sup>.....nicotinamida adenín dinucleótido
- NADH.....nicotinamida adenín dinucleótido reducido
- NADP<sup>+</sup>.....nicotinamida adenín dinucleótido fosfato
- NADPH.....nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
- NEM .....N-etil-maleimida
- NO<sub>3</sub> Red. ....nitrate reductasa
- pMB .....para-hidroximercuribenzoato
- Tris.....tri (hidroximetil)-amino metano

La existencia de mecanismos de control en los puntos clave de la enrevesada red de reacciones químicas que constituyen el metabolismo, es la base del buen funcionamiento de la complicada máquina que supone un ser vivo.

Este control se realiza a través de proteínas enzimáticas que son las que aseguran la coherencia funcional de estos sistemas, por lo que se puede asegurar que toda estructura teleonómica de un ser vivo, desde el punto de vista estructural y funcional, puede, en principio, ser analizada en términos de interacciones estereoespecíficas entre proteínas y otras moléculas.

En la última década se ha producido un avance espectacular en nuestros conocimientos acerca de los numerosos procesos de regulación y de las funciones metabólicas que tienen lugar en la célula.

El presente trabajo pretende aportar nuevos datos que ayuden al esclarecimiento del mecanismo de regulación de la nitrato reductasa, que es uno de los numerosos ejemplos de enzimas cuya actividad está sometida a regulación metabólica.

## I. INTRODUCCION

Los organismos que utilizan nitrato como fuente de nitrógeno poseen una única vía de reducción de este compuesto, la cual está constituida por dos pasos enzimáticos sucesivos. El primer paso, reducción de nitrato a nitrito, supone un cambio en el número de oxidación del átomo de nitrógeno de +5 a +3 y está catalizado por la nitrato reductasa, que realiza la transferencia de electrones desde un piridín nucleótido reducido hasta el nitrato. El siguiente paso, la conversión del nitrito a amonio, está catalizado por la nitrito reductasa y lleva consigo un cambio en el número de oxidación del átomo de nitrógeno de +3 a -3, es decir, es necesaria la transferencia de 6 electrones para que esta reducción tenga lugar. En el presente trabajo hemos dedicado nuestra atención solamente a la nitrato reductasa.

La diferencia más aparente entre las nitrato reductasas de distintos organismos consiste en la distinta especificidad para el donador de electrones que utilizan en la reducción del nitrato. Las nitrato reductasas de bacterias (1,2,3) y de algas y plantas superiores (4,5,6) utilizan específicamente NADH, mientras que las de hongos requieren NADPH como donador de electrones (7,8,9,10). No obstante la

distinta especificidad por los piridín nucleótidos reducidos, las nitrato reductasas de estos organismos poseen unas características funcionales muy similares.

*Nitrato reductasa de algas y plantas superiores.*

La nitrato reductasa de algas y plantas superiores es un complejo enzimático con dos actividades parciales que se pueden ensayar independientemente. La primera actividad es una NADH-diaforasa que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH a la segunda porción del complejo, o bien a ciertos aceptores de electrones como son el citocromo c, el ferricianuro o el 2,6-diclorofenol-indofenol (11, 12). La segunda actividad del complejo, FMN<sub>2</sub>-nitrato reductasa o nitrato reductasa terminal, contiene molibdeno y puede utilizar como donador de electrones para la reducción de nitrato la porción diaforásica reducida por NADH, o bien flavín nucleótidos o viológenos reducidos (13).

Aparentemente la nitrato reductasa es una flavoproteína que contiene FAD como grupo prostético, el cual es necesario para que se manifieste la actividad NADH-diaforasa (14,15).

La nitrato reductasa de espinaca se inactiva por el reactivo de grupos sulfhidrilo pMB (14,16). La actividad NADH-diaforasa del complejo enzimático es muy sensible a este reactivo, y su pérdida va acompañada de la inactivación de la NADH-nitrato reductasa; la segunda actividad parcial del complejo puede también inactivarse por pMB, pero es mucho menos sensible a este reactivo que la diaforasa, y por ello su inactivación requiere concentraciones relativamente altas de pMB (17,18). Se han encontrado efectos semejantes sobre la nitrato reductasa de Ankistrodesmus braunii (19) y de Chlorella fusca (20). Estos resultados indican la existencia de grupos sulfhidrilo en el complejo enzimático y cómo la modificación con pMB de los grupos más reactivos produce la inactivación de la NADH-diaforasa. El NADH protege a la nitrato reductasa de Chlorella (20) y espinaca (18), y el FAD solo a la de espinaca (18), de la inactivación por pMB.

La NADH-diaforasa también se inactiva al mantener la preparación a temperatura ambiente en contacto con el aire (21). Los tioles protegen a la NADH-diaforasa de la inactivación, lo cual indica que ésta se debe a la oxida-



ción de los grupos sulfhidrilo antes mencionados (22). El  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$  y  $\text{ADP}$ , pero no el  $\text{NADP}^+$  y  $\text{NADPH}$ , protegen también de la inactivación espontánea (23) probablemente al hacer inaccesibles los grupos sulfhidrilo que se discuten, bien indirectamente por efecto de un cambio de conformación del enzima, o bien porque los grupos  $-\text{SH}$  pertenecen al sitio de unión de los compuestos mencionados.

También es sensible la  $\text{NADH}$ -diarofasa, tanto de *Chlorella fusca* (15), como de espinaca (18) al tratamiento térmico, puesto que el calentamiento a  $45^\circ\text{C}$  durante 5 minutos la inactiva completamente. Sin embargo este tratamiento no afecta a la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. El  $\text{FAD}$  a concentraciones muy pequeñas ( $10 \mu\text{M}$ ) protege totalmente de la inactivación (15).

El complejo nitrato reductasa contiene molibdeno y la presencia de este metal es necesaria para que muestre actividad de  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa (24,25). Si el molibdeno se sustituye por wolframio, se obtiene un complejo carente de esta actividad parcial y, por tanto, de la  $\text{NADH}$ -nitrato reductasa (26,27).

La  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa, pero no la NADH-diafo-  
rasa, se inhibe por cianuro, carbamil fosfato y azida (18,  
20). La inhibición por estos compuestos es de caracter com-  
petitivo con respecto al nitrato (28).

Vennesland y Jetschman, 1971 (29), al mantener  
una preparación activa de NADH-nitrato reductasa de Chlorella  
vulgaris en presencia de NADH, observaron un descenso  
de esta actividad enzimática. En aquel tiempo no se pudo  
dar una explicación a este hecho. Por otra parte Vega et  
al (20) mostraron que el efecto inhibitor del cianuro sobre  
la nitrato reductasa de Chlorella fusca era mucho mayor  
cuando el enzima, previamente a la adición de cianuro, se  
había incubado con NADH. Esta inhibición no se eliminaba  
al pasar la preparación tratada con NADH y cianuro por Se-  
phadex G-25, a diferencia de lo que ocurría cuando el en-  
zima se había incubado con cianuro solo. Sin embargo, la  
actividad enzimática podía recuperarse por adición de fe-  
rricianuro, lo cual parecía indicar que algunas propieda-  
des del enzima, como es la afinidad por el cianuro, son  
dependientes del estado oxidado o reducido de la proteína.

Debido a que no se ha logrado purificar todavía el complejo NADH-nitrato reductasa de algas y plantas superiores, se tienen pocos datos acerca de su estructura. No obstante se ha determinado por filtración en agarosa el peso molecular del enzima de Chlorella fusca (30) y espinaca (31), que es alrededor de 500.000. Otros autores han dado valores similares (500.000-600.000) para el enzima de hojas de trigo (5) y valores submúltiplos para enzimas de variados orgáneos: 230.000 para el de Neurospora crassa (8) y 160.000 para el de maíz (5); lo cual sugiere que el complejo enzimático tenga un carácter oligomérico con distintos grados de agregación (6).

Mediante experimentos en los que se utilizaron de forma paralela técnicas bioquímicas y genéticas de complementación in vitro, el grupo de Nason (32,33,34) ha puesto de manifiesto que la NADPH-nitrato reductasa de Neurospora crassa es un heteromultímero formado por, al menos, dos subunidades distintas codificadas por genes diferentes. Se han encontrado cinco genes distintos para la nitrato reductasa, por lo que pudieran ser más de dos las subunidades que la integran. Una de estas subunidades, de

peso molecular 50.000, es de naturaleza inducible y parece ser la NADPH-diaforasa. El segundo componente,  $\text{FNN}_2$ -nitrato reductasa, es una subunidad constitutiva que se encuentra presente en su forma inactiva, a menos que se combine con la subunidad NADPH-diaforasa. Estos autores consiguieron restablecer in vitro la actividad NADPH-nitrato reductasa al incubar el extracto de un mutante con actividad NADPH-diaforasa, pero carente de actividad  $\text{FNN}_2$ -nitrato reductasa, con extractos de otros mutantes que no presentaban ninguna de las dos actividades parciales del complejo. También pudieron asociar la subunidad NADPH-diaforasa de Neurospora crassa con las subunidades con molibdeno de otros molibdoenzimas como son la NADH-nitrato reductasa de Setaria faberii, la nitrato reductasa respiratoria de Escherichia coli, la aldehído y la sulfito oxidasa de hígado de buey y las nitrogenasas procedentes de Clostridium pasterianum y Azotobacter vinelandii y del bacteroide Glicine max. del nódulo de cebada, todos los cuales habían sido previamente separados en subunidades mediante tratamiento con ácido. En todos los casos se pudo restablecer la actividad de estas enzimas que utilizaron NADPH en lugar de NADH como donador de electrones por

poseer la subunidad NADPH-diaforasa de Neurospora.

De acuerdo con estos resultados podemos concluir que la nitrato reductasa de Neurospora crassa, y posiblemente de la generalidad de los organismos que asimilan nitrato, está constituida al menos por dos subunidades, cada una de las cuales posee una actividad enzimática. Por otra parte, la subunidad que contiene molibdeno es funcionalmente análoga en todos los molibdoenzimas estudiados.

La regulación de la síntesis de la nitrato reductasa ha sido, y sigue siendo, un tema muy discutido habiéndose propuesto una gran cantidad de compuestos como inductores o represores nutricionales de su síntesis. Actualmente, la mayor parte de los autores afirman que en plantas superiores el nitrato actúa como inductor nutricional de este enzima (35), aunque los experimentos realizados no son totalmente convincentes.

Sin embargo, los dos enzimas del sistema reductor del nitrato en Chlorella fusca, es decir la nitrato y la

nitrito reductasas, están sujetos a represión nutricional por amonio (36), ya que, cuando se añade amonio a un medio con nitrato, los valores de la nitrato y la nitrito reductasas, así como de la diaforasa, descienden notablemente, mientras que la eliminación del amonio devuelve las actividades enzimáticas hasta sus niveles originales. Esta recuperación de la actividad es sensible a la cicloheximida, lo cual indica que se requiere para ella la síntesis "de novo" de proteína. En Chlamydomonas reinhardtii se ha encontrado un fenómeno semejante (37).

Además de esta regulación de la nitrato reductasa mediante represión nutricional de su síntesis por amonio, se ha encontrado otro efecto muy interesante de este compuesto sobre la actividad del complejo NADH-nitrato reductasa. La adición de amonio a células de Chlorella que crecían logarítmicamente en un medio con nitrato, provocó la desaparición de la actividad  $\text{FNNH}_2$ -nitrato reductasa y, en consecuencia, de la NADH-nitrato reductasa, sin que se afectase la NADH-diaforasa. Al eliminar el amonio del medio de cultivo, se recuperó rápidamente el nivel inicial de  $\text{FNNH}_2$ -nitrato reductasa. La reactivación in vitro del

enzima inactivo, obtenido de un cultivo tratado con amonio, se consiguió manteniendo el extracto crudo a 0-5°C durante algunas horas (35).

En contraste con los resultados anteriores, el grupo de Vennesland ha encontrado que la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris se obtiene siempre inactiva en el extracto crudo, aunque puede ser reactivada en presencia de nitrato y fosfato a pH bajo (29).

La nitrato reductasa del alga termocidófila Cyanidium caldarium (38), como la de Chlorella fusca (36), se obtiene en forma inactiva después del tratamiento del cultivo con amonio. Esta forma inactiva puede reactivarse por calentamiento a 75°C del extracto crudo. También se consigue una cierta reactivación con fosfato, urea y pMB (38).

En nuestro laboratorio se ha encontrado que el ferricianuro provoca la reactivación de la nitrato reductasa tanto de Chlorella fusca (39) como de Chlamydomonas reinhardtii (37). Posteriormente Vennesland ha descrito la reactivación por oxidantes y la inhibición por CO de este proceso (40).

Todos estos resultados apuntaban a que el enzima obtenido in vivo, por la presencia de amonio en el cultivo, se encontraba en un estado reducido y que su oxidación in vitro le devolvía la actividad.

El amonio es un conocido agente desacoplante de la fotofosforilación no cíclica (41). Es interesante que otro agente desacoplante de la fotofosforilación, como es el arseniato, provoque la inactivación de la segunda mitad del complejo NADH-nitrato reductasa exactamente igual que el amonio (42). Este efecto inactivante sobre la nitrato reductasa in vivo, tanto del amonio como del arseniato ha sido explicado por Losada et al (42) admitiendo que estos compuestos, como consecuencia de su efecto desacoplante de la fotofosforilación, producen un acúmulo de poder reductor y ADP en la células y que este poder reductor es el responsable de la inactivación al producir la reducción del enzima. Esta interpretación se apoya en una serie de experimentos en los que se sometieron las células de Chlamydomonas reinhardtii a unas condiciones que modificaban su nivel de oxidación-reducción. Las condiciones que favorecían la acumulación en



la célula de poder reductor, como es la anaerobiosis, produjeron la inactivación de la nitrato reductasa aún en ausencia de amonio o arseniato. Por otra parte sí, cuando es tos compuestos estaban presentes, se impidió el acúmulo de NAD(P)H añadiendo al cultivo menadiona o DCMU, o bien se mantuvo éste en la oscuridad, la inactivación no tuvo lugar (42). Estos resultados sugieren la existencia de un me canismo de regulación dependiente del nivel redox en la cé lula.

Los datos anteriores, así como las que se presentan en este trabajo acerca de la inactivación in vitro de las nitrato reductasas de Chlorella fusca y Spinacea ole racea, indican que la nitrato reductasa de algas y plantas superiores se encuentra en dos formas moleculares distintas, una oxidada que es activa y otra reducida que es la inactiva, siendo ambas formas interconvertibles.

#### *La interconversión enzimática como un mecanismo de regulación*

Ya que la nitrato reductasa parece estar regulada por un mecanismo de interconversión, presentamos ahora un resumen de los aspectos más sobresalientes de las intercon

versiones enzimáticas descritas hasta ahora.

Los enzimas interconvertibles existen en dos formas moleculares distintas, con propiedades catalíticas diferentes. A la forma catalíticamente más activa en condiciones fisiológicas se le designa como forma a, mientras que a la menos activa se le llama forma b.

La interconversión entre las dos formas del enzima tiene lugar mediante una modificación química de la proteína, la cual lleva consigo la formación o ruptura de un enlace covalente y la adición o eliminación de un grupo específico. Las modificaciones químicas conocidas hasta ahora que producen interconversión son: *fosforilación*, encontrada en la glucógeno fosforilasa (43,44), glucógeno fosforilasa b quinasa (45,46) y glucógeno sintetasa (47,48), todas ellas de mamíferos, las piruvato deshidrogenasas de músculo y Escherichia coli (49) y la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa de E. coli (50); *adenzilación*, en la glutamina sintetasa (51) y la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa (52), las dos de E. coli; y adición de un grupo ADP-ribulosa, en las translocasas de mamíferos y levaduras (53). También ha sido propuesto como mecanismo de interconversión la redu-

ción de puentes disulfuro para producir grupos sulfhidrilo (54).

Las modificaciones químicas que producen interconversión están catalizadas por enzimas específicos distintos del enzima interconvertible sometido a la regulación, y se se parables de éste. A estas proteínas enzimáticas se les llama enzimas modificadores o reguladores. En el caso de la glucógeno fosforilasa la forma b se convierte en la a mediante una fosforilación catalizada por el enzima glucógeno fosforilasa b quinasa. Este enzima, a su vez, existe en dos formas interconvertibles. La forma más activa de la fosforilasa quinasa, la forma a, se obtiene por fosforilación de la menos activa, la forma b, catalizada por el enzima glucógeno fosforilasa b quinasa quinasa (45). La producción de la forma b de la fosforilasa quinasa a partir de la forma a está catalizada por una fosforilasa. Por otra parte, la conversión de la forma a de la glucógeno fosforilasa en la forma b está catalizada por una fosforilasa que, a su vez, parece ser interconvertible (55).

El mecanismo de interconversión posee una serie de propiedades características que lo distinguen de los otros

mecanismos celulares de regulación enzimática. Estas propiedades hacen de la interconversión el mecanismo adecuado para la regulación de enzimas que catalizan reacciones críticas en el metabolismo (54,56).

La modificación química de enzimas mediante una reacción catalizada enzimáticamente proporciona un mecanismo para la amplificación de una determinada señal reguladora. Así, la activación del enzima regulador con una concentración muy baja de un efector produce un cambio muy importante en la actividad del enzima regulado por interconversión. De esta forma, puesto que cada catalizador produce la activación de una cantidad mucho mayor del siguiente catalizador, el efecto primario del efector se amplifica muchas veces.

Por otra parte, aunque el efector haya desaparecido de la célula, se mantiene su acción sobre el metabolismo, puesto que las formas interconvertibles de un enzima son estables en ausencia del efector. Únicamente la acumulación de otro efector que estimule la reacción inversa restaura la situación original. Esta continuidad del efecto regulador aún después de desaparecer el compuesto desencadenante represen-

ta una notable diferencia respecto a otros tipos de regulación, en los cuales la actividad del enzima responde de una forma inmediata a un aumento o descenso en la concentración del efector.

La interconversión es un mecanismo de regulación que requiere un gasto energético muy pequeño, si se compara con la inducción y represión de la síntesis "de novo" del enzima.

En organismos fotosintéticos la actividad de ciertos enzimas importantes en el metabolismo del  $\text{CO}_2$  están controlados aparentemente por el estado de oxido-reducción de la célula, el cual depende principalmente de la presencia o ausencia de luz. Los cambios en el nivel redox de la célula podrían afectar a la actividad enzimática al provocar la ruptura de puentes disulfuro del enzima, o la formación de estos a partir de grupos -SH. Estas modificaciones químicas irían acompañadas de cambios en la actividad enzimática. Aunque no se ha demostrado todavía la existencia de este tipo de interconversión, ciertos enzimas del metabolismo del

$\text{CO}_2$  podrían estar regulados de esta forma (57).

El primer enzima de este tipo es la ribulosa-1,5 difosfato carboxilasa que cataliza la incorporación del  $\text{CO}_2$  al material celular mediante la carboxilación de la ribulosa 1,5 difosfato. La velocidad de la reacción catalizada por este enzima era mucho mayor in vivo que en extractos libres de células. Bassham (58) postuló la activación del enzima bajo iluminación intensa. Posteriormente se describió la activación del enzima en extractos crudos de varios organismos al ser expuesto a la luz, al mismo tiempo que se propuso la existencia de un "factor activador en la luz" (LAF) de naturaleza proteica al que se asignó un papel muy importante en la regulación de todos los procesos fotosintéticos (59). Por otra parte se encontró en espinacas que la ribulosa 1,5 difosfato carboxilasa está formada por dos subunidades, una de las cuales realiza la catálisis enzimática, y otra que tendría propiedades reguladoras (posiblemente el LAF) (60).

La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa es un enzima del ciclo de Calvin, que cataliza la reducción del

ácido 3-fosfoglicérico a 3-fosfoglicéraldehído también está sometido a un mecanismo de regulación por la luz. Existen dos formas de este enzima: una dependiente de  $\text{NAD}^+$ , que se encuentra en tejidos con o sin clorofila, y otra dependiente de  $\text{NADP}^+$  que está presente únicamente en tejidos con clorofila. La forma dependiente de  $\text{NADP}^+$  está implicada en la conversión del ácido 3-fosfoglicérico a triosa fosfato en el ciclo de las pentosas fosfato, y la dependiente de  $\text{NAD}^+$  tiene su función en la vía degradativa de la glucólisis. Tanto en semillas de guisante (61), como en Euglena gracilis (62) y Chlamydomonas reinhardtii (63) no aparece actividad dependiente de  $\text{NADP}^+$  cuando se mantienen estos organismos en la oscuridad. Ahora bien, si las células cultivadas en la oscuridad se pasan a la luz, aparece la actividad dependiente de  $\text{NADP}^+$ , al mismo tiempo que la dependiente de  $\text{NAD}^+$  sufre un descenso. De acuerdo con estos resultados se ha sugerido la existencia de una interconversión entre una forma dependiente de  $\text{NAD}^+$  y otra dependiente de  $\text{NADP}^+$  producida por la luz. La conversión de una forma en la otra se ha llevado a cabo in vitro por efecto del NADPH, en lugar de la luz (64). Recientemente se ha observado que también el DTE es capaz por sí solo de transformar la for-

na dependiente de  $\text{NADP}^+$  en la dependiente de  $\text{NAD}^+$  (65). A la vista de estos resultados se supone que este proceso de interconversión se realice mediante la reducción por NADPH de un grupo -S-S- esencial para la actividad dependiente de  $\text{NAD}^+$ .

Otro de los enzimas que intervienen en la ruta de asimilación del  $\text{CO}_2$ , y que también está sometido a un mecanismo de regulación por la luz es la fructosa difosfatasa, cuya actividad en células de Euglena gracilis cultivadas en la oscuridad es muy pequeña, pero que aumenta de un modo paralelo a la formación de clorofila cuando se pasa a la luz (66). En espinaca, Buchanan et al (67) mostraron que el enzima se activaba de 7 a 10 veces cuando se añadía ferredoxina reducida a un extracto conteniendo la fructosa difosfatasa. El DTE puede reemplazar a la ferredoxina para producir la activación. Esta activación in vitro podría consistir en la reducción por ferredoxina o DTE, o bien en presencia de la luz, de algún grupo -S-S- presente en la proteína (68).

Por último, la ribulosa 5-fosfato quinasa puede



ser activada por la luz en tejidos de espinaca. La activación se puede llevar a cabo in vitro con DTE sin necesidad de la luz, pero no con NADPH (65). Se postula que in vivo el enzima se reduce por un tior endógeno, o bien por un compuesto reducido mediante una reacción fotoquímica, el cual posteriormente reduce, a través de una disulfuro reductasa, a un grupo tiorico que es esencial para la actividad (70)

Aunque todavía no se conoce con exactitud el mecanismo ni el significado fisiológico de estas activaciones e inactivaciones, es significativa la existencia en la vía de asimilación del  $\text{CO}_2$ , de una serie de enzimas controlados, al parecer, por oxidación y reducción.

*Reactivos utilizados en la inactivación y reactivación de la  $\text{FHN}_2$ -nitrato reductasa.*

Para producir la inactivación del enzima se han utilizado reactivos que rompen el puente disulfuro y para su reactivación, aquellos capaces de restaurar el citado

enlace.

Los tioles son los reactivos más específicos para la reducción de los puentes disulfuro de las proteínas (Reacciones 1 y 2) (71)



La constante de equilibrio de estas reacciones es aproximadamente la unidad, y por ello es necesaria la adición de un gran exceso de tior para obtener una reducción completa de los puentes disulfuro. La forma ionizada del tior es la reaccionante, por lo que la velocidad de la reacción depende marcadamente del pH (72).

Además de los monotiores, como el 2-mercaptoetanol y el ácido tioglicólico, se ha utilizado el ditor ditioeritritol (DTE). Con este compuesto las reacciones 1 y 2 se desplazan hacia la derecha debido a que el ditor oxidado forma un ciclo estable (73).

El sulfito también abre los puentes disulfuro con

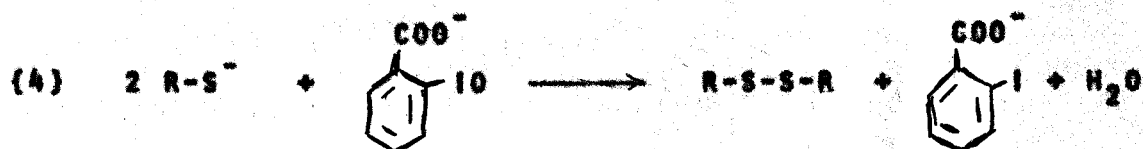
la consiguiente formación de un grupo tiólico y otro S-sulfonato (Reacción 3) (71,74).



El ión  $SO_3^{\equiv}$  es mucho más reactivo que el  $SO_3H^-$ , por lo cual, para favorecer la ruptura del puente disulfuro hay que operar a un pH superior a 7.

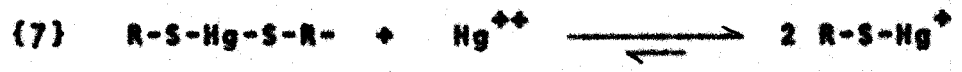
Para reformar los puentes disulfuro a partir de los grupos sulfhidrilo, es necesario el uso de reactivos oxidantes. En este trabajo se han utilizado los siguientes:

— *o*-Iodosobenzoato se ha empleado para modificar la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (75) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (76). La reacción es la siguiente:

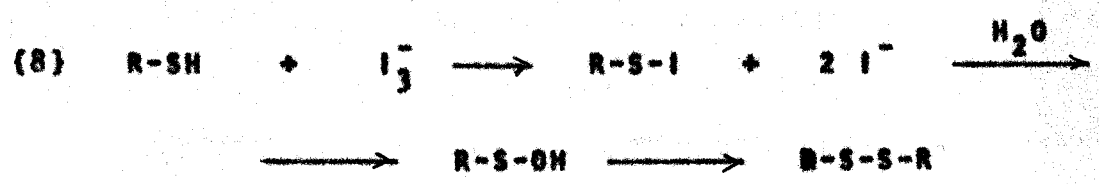


— Las sales mercuríicas reaccionan rápida y eficazmente con los grupos -SH de proteínas según las reacciones 5, 6 y 7, cuyas contribuciones relativas dependen de la concen-

tracción a que se encuentre el ión mercurico (71,74).

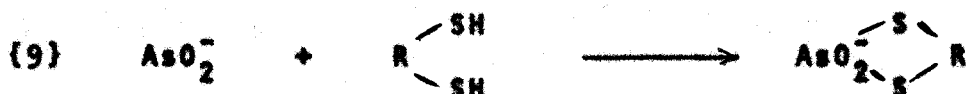


— El *iodo* en solución de yoduro potásico es un reactivo menos específico que los anteriores, el cual, reacciona con los grupos -SH según la reacción 8 (71).



— El *ferricianuro* ha sido descrito como reactivo oxidante de tioles (77). Se ha empleado para la modificación de la ovoalbúmina (78) y, aunque no ha sido demostrado, posiblemente reaccione produciendo un enlace disulfuro (74).

Por otra parte se ha utilizado el *arsénito*, el cual, aunque no produce puentes disulfuro al actuar sobre grupos tiólicos, forma complejos muy estables con los ditioles (Reacción 9) (71).



En el presente trabajo se estudia principalmente la inactivación por piridín nucleótidos reducidos, tioles y sulfito de las nitrato reductasas de Chlorella fusca y Spinacea oleracea, con objeto de esclarecer los cambios químicos que acompañan y son causa de la inactivación, así como el papel que este proceso desempeña en la regulación in vivo del enzima.

Parte de este trabajo ha sido ya publicado (39) o se encuentra en vías de publicación (22,80). También se han presentado comunicaciones a Congresos nacionales (81,82) e internacionales (83).

## II. MATERIALES Y METODOS

## 1. MATERIALES BIOLÓGICOS UTILIZADOS, OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y PURIFICACIÓN DE LA NITRATO REDUCTASA

Los materiales biológicos utilizados en el presente trabajo han sido el alga verde unicelular Chlorella fusca y las hojas de Spinacea oleracea.

### 1.1. Chlorella fusca

El alga verde Chlorella fusca Sihira et Krauss — (= C. pirenoidosa Chick) 211-215 se obtuvo de la colección Pringsheim de Göttingen.

El medio de cultivo era esencialmente el mismo que el descrito por Kessler (84), y contenía los siguientes compuestos a las concentraciones que se indican:

$\text{NO}_3\text{K}$ , 24 mM;  $\text{ClNa}$ , 8 mM;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ , 1 mM;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ , 3 mM;  
 $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 1 mM;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 0,1 mM;  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , 20  $\mu\text{M}$ ;  $\text{Cl}_2\text{Mn}$ , 2,5  $\mu\text{M}$ ;  
 $\text{BO}_3\text{H}_3$ , 8  $\mu\text{M}$ ;  $\text{SO}_4\text{Zn}$ , 0,7  $\mu\text{M}$ ;  $\text{MoO}_4\text{Na}_2$ , 0,1  $\mu\text{M}$  y EDTA 34  $\mu\text{M}$ .

Este medio de cultivo se usó sin esterilizar ya que, al no contener fuente de carbono y dada la gran masa

de células de Chlorella que se utilizó como inóculo, la contaminación era mínima, como se comprobó por examen microscópico del cultivo.

*Condiciones de cultivo.*— Las células se cultivaron a 25°C en botellones de 5 litros por los que se hacían pasar, mediante borboteo, una corriente de aire conteniendo 5 % de CO<sub>2</sub>. La iluminación se hizo con tubos fluorescentes de luz blanca que proporcionaban 1.200 lux en la superficie del frasco de cultivo.

Para la preparación del inóculo se partió de células cultivadas sobre agar, o bien de las procedentes de anteriores cultivos en medio líquido. Estas células se cultivan en tubos que contienen 250 ml de medio de cultivo en los cuales se dejan crecer hasta alcanzar una densidad óptica de 4,5 a 660 nm, que corresponde a 3-3,4  $\mu$ l de células/ml de cultivo, como se determinó con un hematocrito. El cultivo así obtenido se utiliza como inóculo para un botellón con 5 litros de medio de cultivo. Después de dos días de crecimiento se consigue un cultivo con una densidad óptica a 660 nm de 3,00-4,00. Este cultivo se reparte



entre dos botellones, completando el volumen de cada uno de ellos hasta 5 litros con medio de cultivo. Después de un día de crecimiento el contenido de estos dos botellones se reparte entre cuatro completando, como antes, con medio de cultivo. Al cabo de dos días se recogen las células cuando el cultivo alcanza una densidad óptica de 4,00-4,50 a 660 nm.

*Recogida de las células.* Para separar las células del medio de cultivo se utilizó una centrífuga de flujo continuo funcionando a temperatura ambiente y que proporcionaba una fuerza centrífuga de 10.000 x g. Las células recogidas se suspenden en 150 ml de agua destilada y se centrifugan a continuación durante 5 minutos a 10.000 x g. Esta operación se repite con 70 ml de agua y se recoge el sedimento de células ya lavadas, que contiene aproximadamente 50-60 g de peso seco.

*Preparación del extracto libre de células.* - Las células recogidas se mezclaron con perlas de vidrio de 0,25-0,30 mm de diámetro y una disolución de Tris-ClH 10 mM (pH 7,5), PAD 10 µM. Por cada 20 gramos de células se

añaden 160 g de perlas y 15-17 ml de la disolución tampón. La mezcla se somete a la acción del aparato rompedor Bühler durante 5 minutos a una temperatura de 0-5°C. A continuación se lava con la disolución tampón anterior (50-60 ml por cada 20 g de células) y se filtra esta mezcla a través de cuatro capas de gasa. Las perlas que quedan retenidas en la gasa se lavan de nuevo con el mismo volumen de tampón usado anteriormente y se filtra la mezcla por la gasa. Esta operación se repite otra vez más.

El homogenado así obtenido, se sometió a los pasos de purificación que se describen en Resultados.

## 1.2. Spinacea oleracea

*Procedencia del material.* - Las hojas de espinaca se recogían en el campo de Bormujos (Sevilla) el mismo día de la preparación del extracto.

*Preparación del extracto crudo.* - La preparación del extracto crudo, así como la purificación de la nitrato reductasa, se realizó en cámara fría a 0-4°C.

Se parte de 800 gramos de hojas de espinaca que, después de quitarle las nerviaciones, se lavan con agua destilada y se trituran en una batidora durante cinco minutos, añadiendo 1.400 ml de Tris-ClH 10 mM (pH 7,5). Después de filtrar por una gasa, el homogenado así obtenido se centrifuga durante 20 minutos a 27.000 x g y se recoge el sobrenadante.

*Purificación de la nitrato reductasa de espinaca.-*

Para la purificación de la nitrato reductasa de espinaca se siguió el método descrito por Aparicio (31), que consta de los siguientes pasos: tratamiento con DEAE-celulosa, adsorción en gel de fosfato cálcico, precipitación con sulfato amónico al 50 % y adsorción en alúmina C<sub>γ</sub>.

La preparación así obtenida se precipita con sulfato amónico al 50 % de saturación y el precipitado se disuelve en 5-6 ml de tampón Tris-ClH 50 mM (pH 7,5) que contiene FAD 10 μM; ClNa, 0,2 M; DTE, 1 mM y NO<sub>3</sub>K 10 mM. Esta preparación, que tiene una actividad específica de NADH-nitrato reductasa alrededor de 150 mU/mg, se guarda a 0-5°C, condiciones en las cuales la actividad enzimática se con-

serva bien durante una a dos semanas. Antes de cada experimento se hizo pasar una porción de la preparación anterior por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con la solución requerida.

## 2.- METODOS ANALITICOS

### 2.1.- Determinación de protefna

Para la determinación de la cantidad de protefna se siguió el método de Lowry et al (85), utilizando ovalbúmina como patrón.

### 2.2. Ensayos enzimáticos

La actividad *NADH-diaforasa* se determinó midiendo espectrofotométricamente la velocidad de reducción de citocromo c. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 2 ml, Tris-ClH 100 mM (pH 7,5), NADH 0,15 mM, citocromo c 0,6 mM y la preparación enzimática (86).

La actividad *NADH-nitrato reductasa* se determinó por dos procedimientos distintos. Uno de ellos consiste en determinar la velocidad de oxidación de NADH en la mezcla de reacción, que contiene, en un volumen final de 2 ml, Tris-ClH 100mM (pH 7,5),  $\text{NO}_3\text{K}$  5 mM; NADH 0,15 mM y la preparación enzimática. La velocidad de oxidación de NADH se

determina espectrofotométricamente (87) y, en los experimentos en que la concentración de este compuesto es baja, se mide la disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por el NADH.

También se determinó la actividad NADH-nitrato reductasa mediante la medida del nitrito formado en una mezcla de reacción que contenía, en un volumen final de 1 ml, Tris-ClH 100 mM (pH 7,5),  $\text{NO}_3\text{K}$  10 mM, NADH 0,3 mM y la preparación enzimática (88). Después de incubar a  $30^\circ\text{C}$  durante 5 minutos se detiene la reacción agregando 1 ml de reactivo de sulfanilamida, seguida de la adición de 1 ml de reactivo de N(-naftil) etiléndiamina (89). Se deja desarrollar el color durante 10 minutos antes de la lectura en el fotocolorímetro.

La actividad FMN<sub>2</sub>-nitrato reductasa se determinó del mismo modo que la NADH-nitrato reductasa, pero usando en este caso como donador de electrones FMN reducido con  $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$  (8 mg de  $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$  en 1 ml de una disolución de  $\text{CO}_3\text{HNa}$  de 8 mg/ml). La reacción se detiene mediante agitación vigorosa hasta la aparición del color

amarillo del FMN oxidado (88).

La actividad enzimática se expresa en todos los casos como micromoles de sustrato (NADH) consumido, o productos (citocromo c 6 nitrito) formados por minuto a 25°C.

### 2.3. Valoración de la cisteína

Para valorar la cisteína que aparece al reducir la cistina con DTE se siguió el procedimiento descrito por Zahler y Cleland (90), que consiste en la valoración de los grupos -SH de la cisteína usando DTNB, un compuesto que forma un producto coloreado con los grupos -SH libres. Para retirar del medio el DTE que queda sin reaccionar se añade arsenito sódico en exceso. Este compuesto forma un quelato con los ditiolos, pero no con los tioles simples, de forma que impide la reacción del DTE con el DTNB sin afectar el ensayo de la cisteína.

#### 2.4. Determinaciones espectrofotométricas y fluorimétricas

La oxidación del NADH se midió a 340 nm y la reducción del citocromo c a 550 nm. Los productos coloreados que aparecen al valorar el nitrito se midieron a 540 nm y los que aparecen al valorar la cisteína, a 421 nm.

Los coeficientes de extinción molar usados han sido los siguientes: para el NADH  $6,2 \times 10^3$ , para el citocromo c reducido  $27 \times 10^3$  y para el producto de la reacción del DTNB con la cisteína  $13 \times 10^3$ . Para la determinación de la cantidad de nitrito formado se construyó una recta de calibrado con concentraciones conocidas de nitrito.



### 3. REACTIVOS Y APARATOS

#### 3.1. Preparación del gel de fosfato cálcico

Se preparó como describe Wood (71), añadiendo 150 ml de una disolución de cloruro cálcico (88,6 g de  $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  por litro) a 160 ml de agua destilada. A continuación, se añaden agitando 150 ml de fosfato trisódico (152 g de  $\text{PO}_4\text{Na}_3 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  por litro) y se ajusta el pH a 7,4 con ácido acético 1 M. El precipitado se lava cinco veces con agua destilada, se centrifuga y se resuspende en la cantidad de agua destilada necesaria para que la concentración sea de 10 mg/ml. Para conocer la concentración de fosfato cálcico de esta suspensión se toma una alícuota y se deseca en una estufa a  $100^\circ\text{C}$ , pesando después el residuo sólido.

#### 3.2. Procedencia de los productos químicos

El  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+$ ,  $\text{NADPH}$ , FMN, FAD, pMB, sulfato de protamina, DTNB, o-iodosobenzato, NEM y cistina se obtuvieron de SIGMA, St. Louis, USA; el DTE y citocromo c de SERVA, Heidelberg, Alemania; el sulfito sódico,

70  
48

2-mercaptoetanol, arsenito sódico, cianuro y ferricianuro potásicos, de MERCK, Darmstadt, Alemania; el azul dextrano y Saphadex de PHARMACIA, Upsala, Suecia; las perlas de vidrio de S. BRAUN, Melsungen, Apparatebau, Alemania y el sulfato de estreptomina de la Cfa. Española de Penicilina. Todos los demás productos utilizados eran de grado analítico.

El agua utilizada para preparar las soluciones y lavar el material de laboratorio era agua desionizada por cambio iónico en un desmineralizador SETA tipo R-100 serie 2/67 y el CO<sub>2</sub> fué suministrado por Coromina Industrial.

### 3.3. Aparatos

Las medidas de densidad óptica se realizaron con los siguientes espectrofotómetros: Beckman DK-2A, PYE UNICAM 1.800, Spectronic 700 y Spectronic 20, estos dos últimos de Bauch & Lomb.

El espectrofotofluorímetro empleado fué de la

ca ANINCO BOWMAN con registro automático.

Para las cromatografías en columna, se utilizaron columnas fabricadas por PHARMACIA, Upsala, Suecia, con dispositivo adaptador de flujo.

El colector automático de fracciones era un LKB modelo Ultrarac 7.000.

Para la recogida de células se utilizó una centrífuga SORVALL KSB de flujo continuo Szent-Giorgy y Blum. En el resto de las centrifugaciones se utilizó una centrífuga SORVALL RC2-B refrigerada.

Para la medida del pH se utilizó un aparato medidor de pH METROHM HERISAU modelo E 512.

### **III. RESULTADOS**

## 1. PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca

Para la purificación de la nitrato reductasa de Chlorella se siguió fundamentalmente el procedimiento descrito por Aparicio (31) con algunas modificaciones, la mas importante de las cuales consistió en incluir una cromatografía en columna de DEAE-Sephadex A-50.

El procedimiento de purificación (Tabla 1) consta de los siguientes tratamientos que se detallan a continuación, todos los cuales se realizaron a 0-5°C.

1ª *Precipitación con sulfato de estreptomioina.*- Por cada 10 ml del homogenado color verde oscuro, preparado como se describe en "Materiales y Métodos", se añaden gota a gota y con agitación 0,75 ml de una disolución de sulfato de estreptomioina (73 mg/ml) ajustada a pH 7,0 con HONa 1 N. Después de incubar 10 minutos con agitación ocasional, se centrifuga a 27.000 x g durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante que ya tiene un color pardo amarillento (Preparación 1, Tabla 1).

2ª *Adsorción en gel de fosfato cálcico.*- A cada 100 ml del sobrenadante anterior se le añaden, lentamente y con agitación, 20 ml de una suspensión de gel de fosfato cálcico, preparado como se describe en "Materiales y Métodos". Después de 10 minutos, durante los cuales la mezcla se agita ocasionalmente, ésta se centrifuga a 4,000 x g durante 5 minutos. El precipitado se resuspende en 40 ml de una disolución de fosfato potásico 25 mM (pH 7,5) y se centrifuga inmediatamente a 4,000 x g durante 10 minutos. Después de desechar el sobrenadante, el precipitado se resuspende en 25 ml de pirofosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), y la suspensión se mantiene durante 10 minutos con agitación ocasional, después de los cuales se centrifuga a 27,000 x g durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante (Preparación II, Tabla I).

3ª *Precipitación con sulfato de protamina.*- Con objeto de eliminar los ácidos nucleicos, al sobrenadante anterior se le añade gota a gota y agitando una disolución de sulfato de protamina al 2% (ajustada a pH 4,0 con HONa 1 M) hasta obtener una concentración final de 0,6%. Después de 10 minutos durante los cuales la mezcla se agita ocasionalmente, ésta se centrifuga durante 10 minutos a 27,000 x g y se desecha el precipitado.

**Tabla I**

**PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca**

<b>Preparación</b>	<b>Proteína total (mg)</b>	<b>Actividad total (unidades)</b>	<b>Recuperación (%)</b>	<b>Actividad específica NADH-NO<sub>3</sub> Redu (milliunidades/mg)</b>
<b>I. Sobrenadante del precipitado con estreptomina</b>	1150	39	100	33
<b>III. Eluato del gel de fosfato cálcico</b>	247	38	97	152
<b>III. Precipitado con sulfato amónico</b>	156	27	69	170
<b>IV. Fracciones más activas de la cromatografía en DEAE-Sephadex A-50</b>	3,2	23	59	730

**4ª Precipitación con sulfato amónico.**- Al sobrenadante libre de ácidos nucleicos se le añade una disolución saturada de sulfato amónico (ajustada a pH 7,0 con  $\text{HONH}_2$  concentrado) hasta alcanzar 45 % de saturación. Después de mantener la mezcla durante 15 minutos con agitación ocasional, se centrifuga durante 10 minutos a  $27.000 \times g$  y el precipitado se disuelve en 5-7 ml de una disolución tampón de fosfato potásico 0,06 M (pH 7,5),  $\text{ClNa}$  0,15 M y FAD 10  $\mu\text{M}$ .

Con objeto de eliminar las sales de la preparación así obtenida, ésta se hace pasar a través de una columna de Sephadex G-25 (2,5 cm  $\varnothing$  x 10 cm altura) equilibrada con la disolución tampón de fosfato descrita anteriormente. Se recogen 10-12 ml de eluato, que contiene la nitrato reductasa libre de sales (Preparación III, Tabla I). Con esta preparación se han realizado algunos de los experimentos que se describen más adelante.

**5ª Cromatografía en columna de DEAE-Sephadex A-50.**- La disolución anterior se aplica a una columna de DEAE-Sephadex A-50 (2,5 cm  $\varnothing$  x 36 cm altura) equilibrada con la disolución tampón de fosfato antes mencionada. La elución se realiza



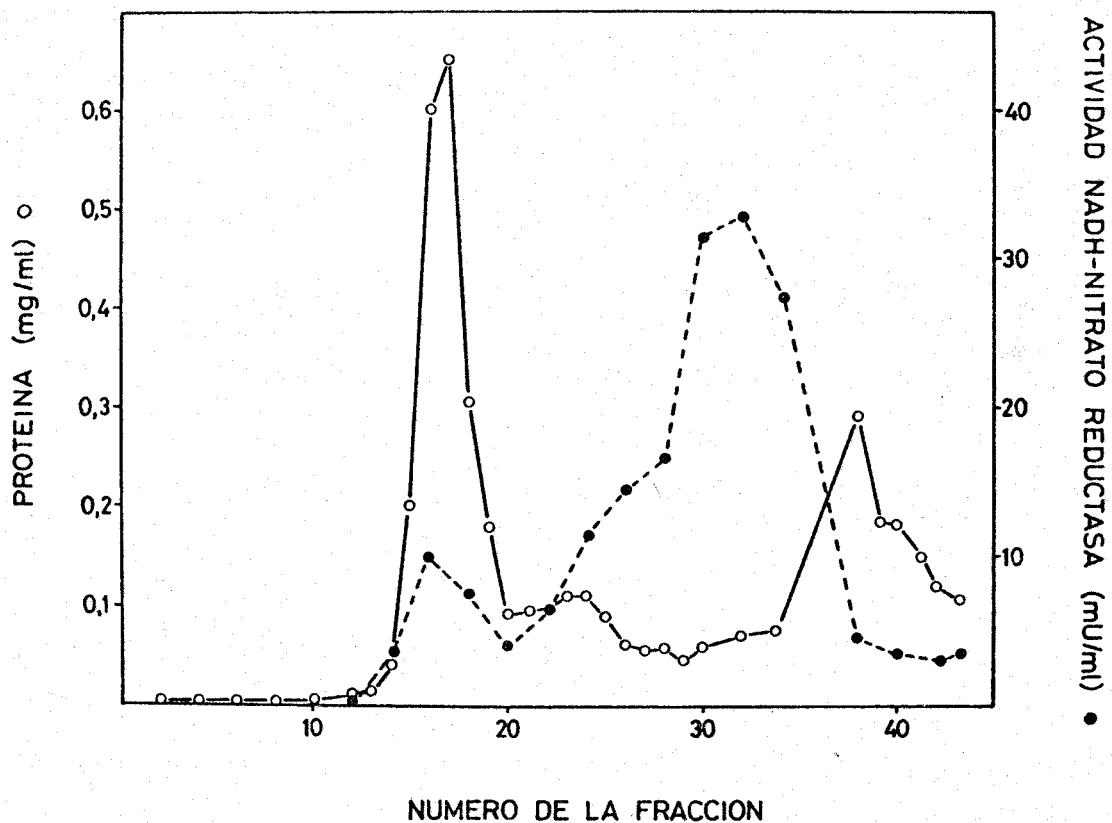


Fig 1. Elución de la nitrato reductasa de *Chlorella* de una columna de DEAE-Sephadex A-50.- 12 ml de la Preparación III conteniendo 28 mg de proteína se aplicaron a una columna de DEAE-Sephadex A-50 y se eluyó como se indica en Resultados. De cada una de las fracciones de 5 ml se toma una alícuota de 0,1 ml para medir la concentración de proteína y la actividad enzimática.

variando la concentración de  $\text{ClNa}$  entre 0,15 y 0,50 N, para proporcionar un gradiente lineal. Se recogen fracciones de 5 ml. El desarrollo de la cromatografía se muestra en la Figura 1, donde puede observarse que la mayor parte de las proteínas aparecen en fracciones diferentes de las que presentan actividad de nitrato reductasa. Se reúnen las fracciones más activas y se les añade una disolución saturada de sulfato amónico hasta alcanzar 50 % de saturación. La mezcla así obtenida se agita ocasionalmente y al cabo de 15 minutos se centrifuga a  $27.000 \times g$  durante 10 minutos. El precipitado así obtenido se disuelve en 3-4 ml de Tris- $\text{ClH}$  50 mM (pH 7,5), FAD 10  $\mu\text{M}$ , y se hace pasar a través de una columna de Sephadex G-25 que había sido equilibrada con la disolución tampón descrita. El eluato de esta columna, que contiene la nitrato reductasa (Preparación IV, Tabla I) se ha utilizado en la mayor parte de los experimentos realizados.

## 2. INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca POR REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILLO

### 2.1 inactivación reversible por parahidroximercuribenzoato

#### 2.1.1. *Efecto del pMB sobre las distintas actividades del complejo enzimático*

Las actividades del complejo enzimático nitrato reductasa de Chlorella presentan distinta sensibilidad frente al tratamiento con pMB. En la Tabla II puede verse que la incubación de la preparación enzimática con pMB a una concentración baja (10  $\mu$ M) produjo una inactivación casi total de la NADH-nitrato reductasa, y que para proporcionar el mismo grado de inactivación de la FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa, la concentración de pMB tuvo que hacerse 100 veces mayor (1 mM). La sensibilidad de la NADH-diaforasa frente al pMB es semejante a la de la NADH-nitrato reductasa.

#### 2.1.2. *Reactivación por DTE del enzima inactivado por pMB*

El compuesto tiólico DTE produce reactivación de la NADH- y FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa inactivadas con pMB. En

Tabla II

EFFECTO DEL pMB SOBRE LAS ACTIVIDADES NADH- Y FNN<sub>2</sub>-NITRATO  
 REDUCTASA DE Chlorella

pMB ( $\mu$ M)	Actividades relativas	
	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa	FNN <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa
0	100	100
10	12	96
50	5	64
250	0	54
1000	0	15

Nitrato reductasa (1,2 mg/ml de preparación III) se incubó a 25°C durante 15 min en presencia de Tris-ClH 100 mM (pH 7,5), FAD 10  $\mu$ M y pMB a las concentraciones que se indican en la tabla. Las actividades enzimáticas se determinaron en las correspondientes alícuotas de las mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin pMB a tiempo cero.

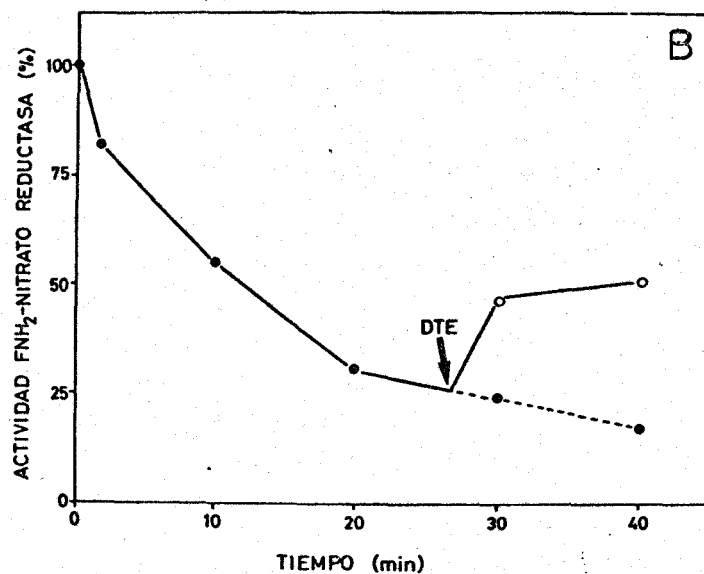
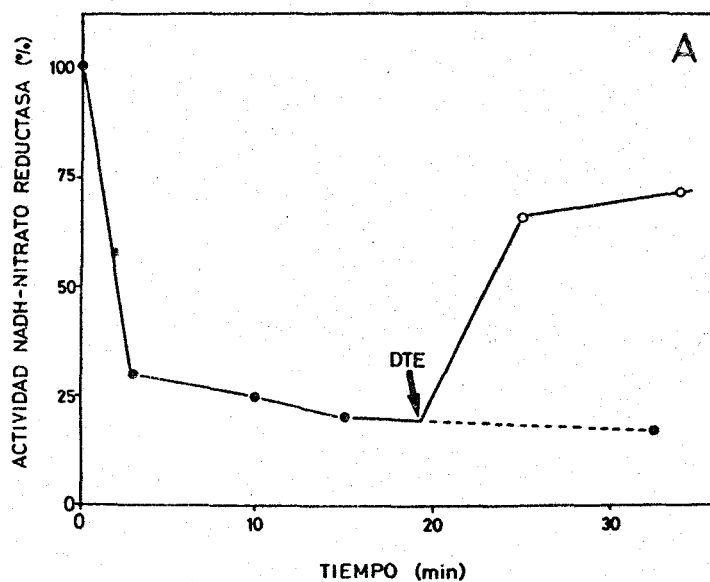


Fig 2. Inactivación de la NADH- y FNH<sub>2</sub>-nitrate reductasa de *Chlorella* por pMB y reactivación por DTE.- La nitrate reductasa (5 mg/ml de preparación III) se incubó a 25°C con Tris-ClH 100 mM (pH 7,5), FAD 10 μM y pMB 10 μM (A) ó 1 mM (B). A los tiempos que se indican se añadió DTE 1 mM a una parte de cada una de las mezclas de incubación (o). Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las mezclas de incubación y se expresan en tantos por ciento de la del correspondiente control sin adiciones a tiempo cero.

la Figura 2 se muestra el curso de la inactivación por PMB de las dos actividades y cómo la adición de DTE produjo la reactivación parcial en los dos casos.

## **2.2. Inactivación por N-etil-maleimida.**

### ***2.2.1. Efecto de la NEM sobre las distintas actividades del complejo enzimático.***

El reactivo N-etil-maleimida, como el PMB, inactiva a la NADH- y FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa. En la Tabla III se muestra el efecto de la NEM sobre las actividades mencionadas. La NADH-nitrato reductasa se mostró más sensible a este reactivo que la FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa.

### ***2.2.2. Protección por NADH de la inactivación por NEM.***

La preincubación con NADH de una preparación enzimática antes de su incubación con NEM protegió a la actividad NADH-diaforasa de la inactivación por NEM (Tabla IV). Otros piridín nucleótidos ensayados no produjeron este efecto.

Tabla III

EFFECTO DEL NEM SOBRE LAS ACTIVIDADES NADH- Y  $FNH_2$ -NITRATO  
 REDUCTASA DE Chlorella

NEM (mM)	Actividades relativas (%)	
	NADH- $NO_3$ Rasa	$FNH_2$ - $NO_3$ Rasa
1	4	60
20	0	37

X La nitrato reductasa (1 mg/ml de preparación III) se incubó a 30°C durante 40 minutos en presencia de Tris-ClH 160 mM (pH 7,5), FAD 10  $\mu$ M y NEM a las concentraciones que se indican en la tabla. Las actividades enzimáticas se determinaron en las correspondientes alícuotas de las mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de las del control sin NEM.

Tabla IV

**INACTIVACION DE LA NADH-DIAFORASA DE Chlorella POR NEM  
Y PROTECCION POR NADH**

Adición	Actividad relativa (%) NADH-diaforasa
Ninguna	6
NAD <sup>+</sup>	9
NADH	72
NADP <sup>+</sup>	7
NADPH	9

La nitrato reductasa (1,3 mg/ml de preparación III) se incubó a 30°C durante 20 minutos en presencia de Tris-CIN 150 mM (pH 7,5), FAD 10 μM, NEM 1 mM y cada uno de los compuestos que se indican en la tabla a la concentración 0,5 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en las correspondientes alícuotas de las mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de la de cada una de las mezclas antes de la adición de NEM, que fue la última.



### 3. INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS

#### 3.1. Inactivación de la nitrato reductasa por NADH y NADPH.

##### 3.1.1. *Efecto del NADH y NADPH sobre las tres actividades del complejo enzimático.*

Los piridin nucleótidos reducidos producen la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa, la cual lleva consigo la pérdida de la actividad NADH-nitrato reductasa. Al incubar con NADH la preparación de nitrato reductasa se produjo una inactivación de la NADH- y  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa y no se observó ningún efecto sobre la NADH-diaforasa (Tabla V). La forma oxidada del piridin nucleótido no afectó de un modo significativo a ninguna de las tres actividades. El NADPH produce efectos sobre las tres actividades del complejo semejantes a las del NADH.

La Figura 3 muestra la cinética de inactivación por NADH de la NADH- y  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. La inactivación en los dos casos parece seguir una cinética de pseudo-primer orden. Cuando se utilizó NADPH, en lugar de NADH,

Tabla V

INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella POR NADH

Adición	Actividades relativas					
	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa		FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa		NADH-diaforasa	
		Tratada con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		Tratada con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		
Ninguna	100	80	100	95		100
NADH	3	60	25	100		93
NAD <sup>+</sup>	87	—	115	—		106

La nitrato reductasa (3mg/ml de preparación III) se incubó a 45°C durante 7 minutos en presencia de Tris-ClH 5 mM (pH 7,5) y FAD 10 µM con NADH ó NAD<sup>+</sup> 0,6 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron después de la incubación en alícuotas de las correspondientes mezclas.

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

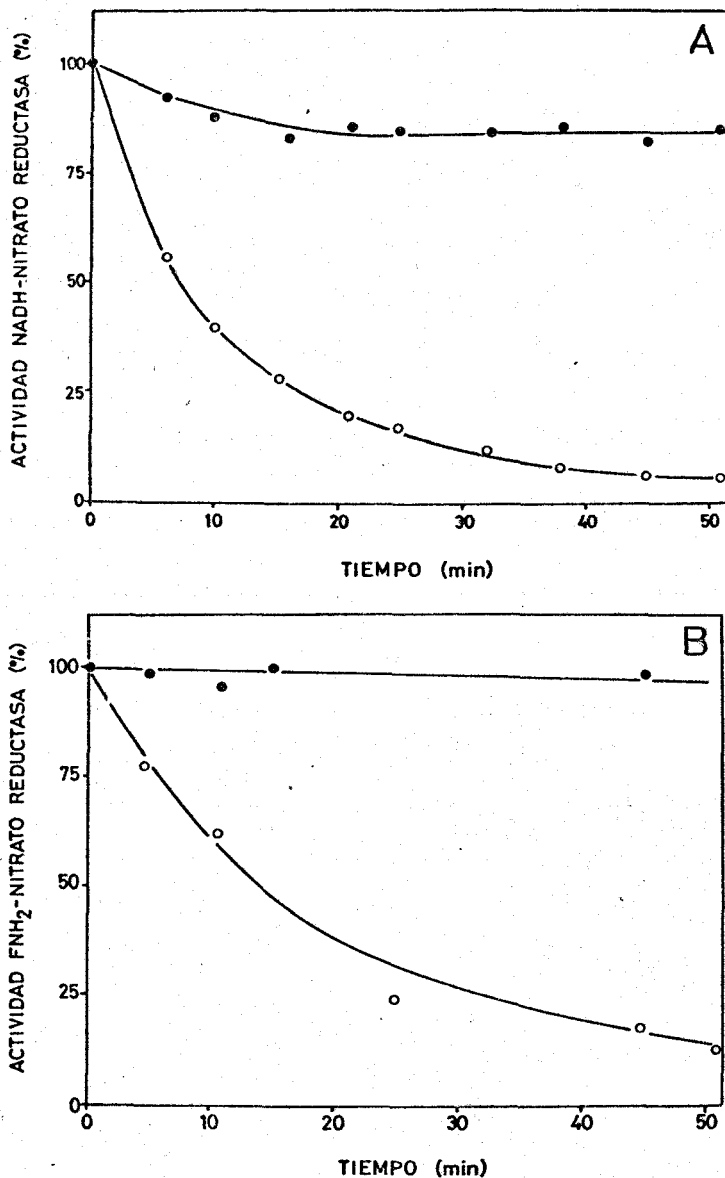


Fig 3. Inactivación por NADH de las actividades NADH- y  $FNH_2$ -nitrato reductasa de *Chlorella*.— La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C en presencia de Tris-ClH 150 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu$ M, con NADH (○), o sin él (●). Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación a los tiempos indicados y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

como agente inactivante, las cinéticas de inactivación fueron semejantes a las anteriores.

### 3.1.2. Efecto de distintas concentraciones de piridín nucleótido reducido sobre la inactivación.

Las Figuras 4 y 5 muestran la inactivación, a distintas concentraciones de NADH y NADPH, de la NADH-nitrato reductasa. Puede observarse, en los dos casos, cómo a una concentración 0,05 mM la inactivación es pequeña durante el tiempo de incubación, y cómo a 1 mM la inactivación es prácticamente total al cabo de 2 horas.

### 3.1.3. Efecto del pH en la inactivación por NADH.

La inactivación por NADH de la PNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa es dependiente del pH. La Figura 6 muestra los resultados obtenidos al incubar el enzima con NADH a distintos valores de pH. Se observa que entre pH 6,0 y 7,0, el enzima conserva el 80-90 % de su actividad original, mientras que a pH 9,0 el NADH provoca la pérdida de más del 50 % de ésta. Entre pH 7,5 y 8,5 hay un cambio en la capacidad de inactivación por NADH, indicando que, posiblemente, esté in

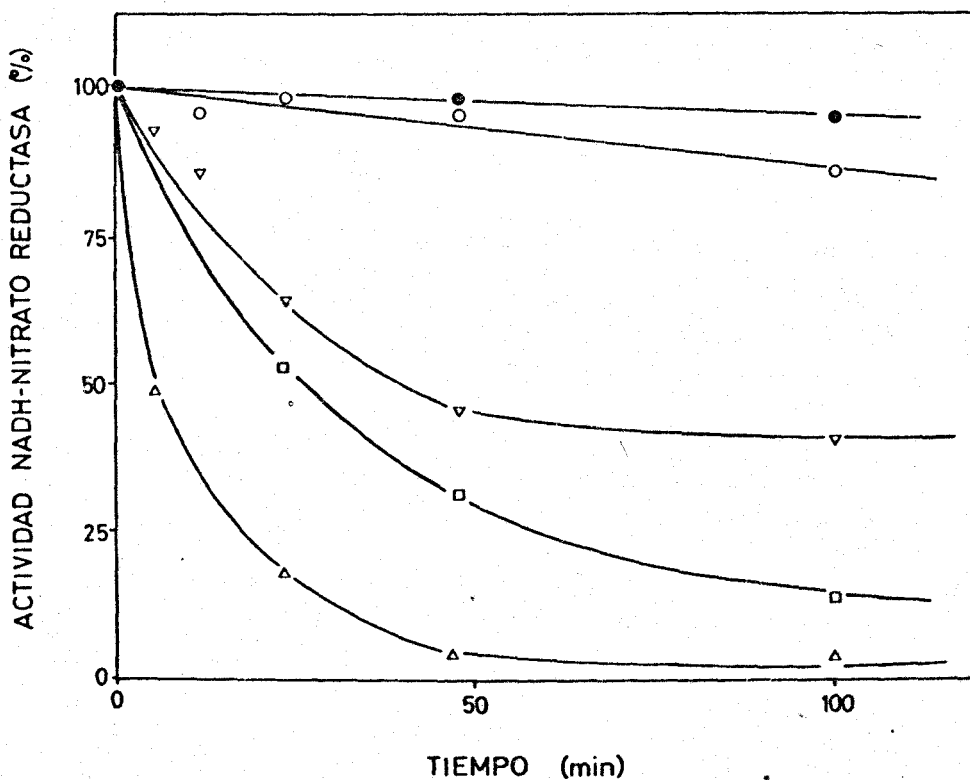


Fig 4. Efecto de la concentración de NADH en la inactivación de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*.— La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25° C en presencia de Tris-ClH 100 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu$ M, con NADH a las siguientes concentraciones: 0 (●), 0,05 (○), 0,3 (▽), 0,6 (□) y 1 mM (△). Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

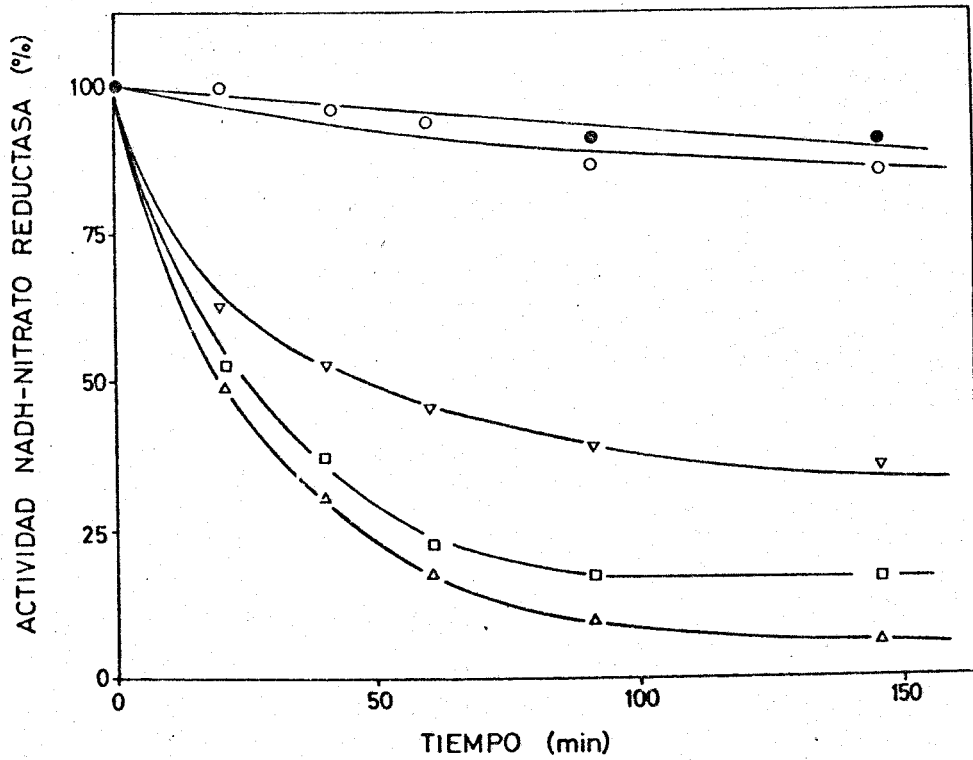


Fig 5. Efecto de la concentración de NADPH en la inactivación de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*.— Como el experimento de la figura 4, pero con NADPH en lugar de NADH.

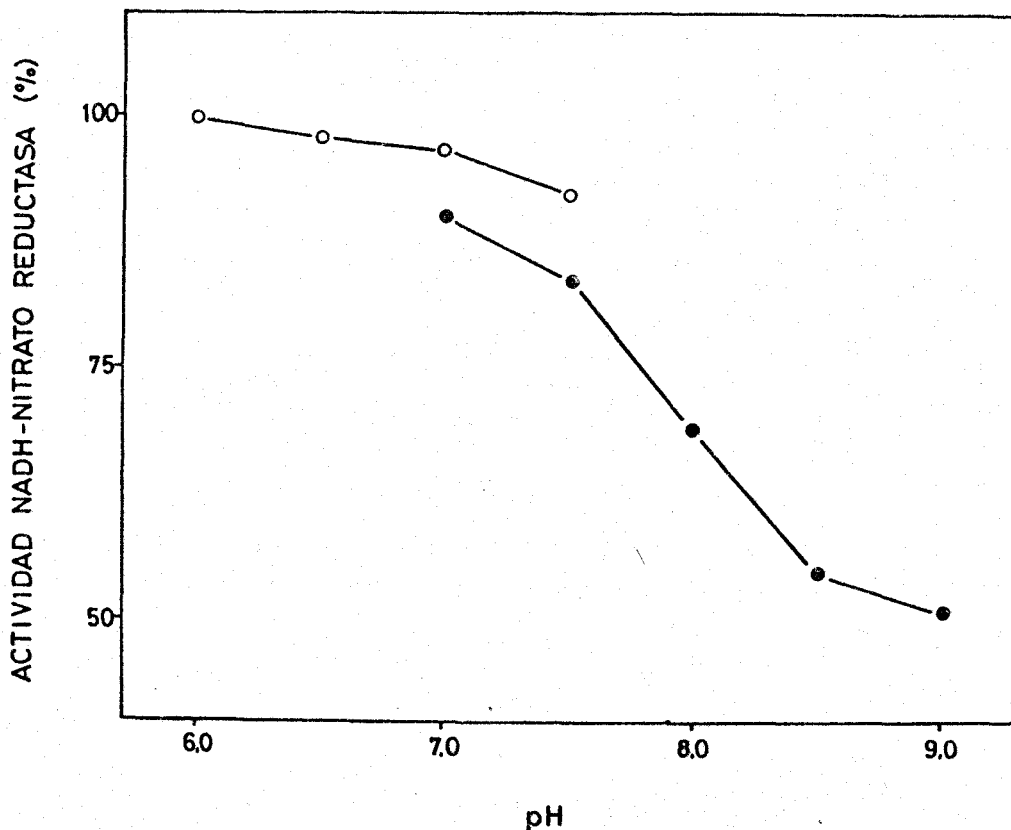


Fig 6. Efecto del pH en la inactivación por NADH de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*.— La nitrato reductasa (0,1 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C durante 1 h con NADH 0,15 mM, FAD 10  $\mu$ M y fosfato potásico (O) ó Tris-ClH (●) 100 mM a los pH indicados. Después de la incubación, la actividad enzimática se determinó en alícuotas de las distintas mezclas de incubación. Las actividades enzimáticas se expresan como tantos por ciento de la del control sin NADH al correspondiente pH y a tiempo cero.

plicado en la inactivación algún grupo ionizable que tenga su pK en esta zona de pH.

Las cinéticas de inactivación por NADH también son distintas a diferentes valores de pH. En la figura 7 se muestran las cinéticas de inactivación por NADH a pH 6,5 y 8,5. En ambos casos se observan dos fases de inactivación, la primera con una constante de velocidad mayor que la segunda. Este fenómeno podrían explicarse admitiendo la existencia de dos formas diferentes del enzima que tuvieran distinta sensibilidad a la inactivación por NADH, o bien suponiendo la existencia de una forma intermedia que tuviera una  $V_{max}$  menor que la del complejo original.

#### 3.1.4. Efecto del NADH sobre la nitrato reductasa modificada por pMB

La modificación parcial con pMB del complejo enzimático, la cual va acompañada de una pérdida de la actividad diaforásica, evita la inactivación de la FNN<sub>2</sub>-nitrato reductasa por NADH. La Tabla VI muestra el alto grado de inactivación de la FNN<sub>2</sub>-nitrato reductasa producido por



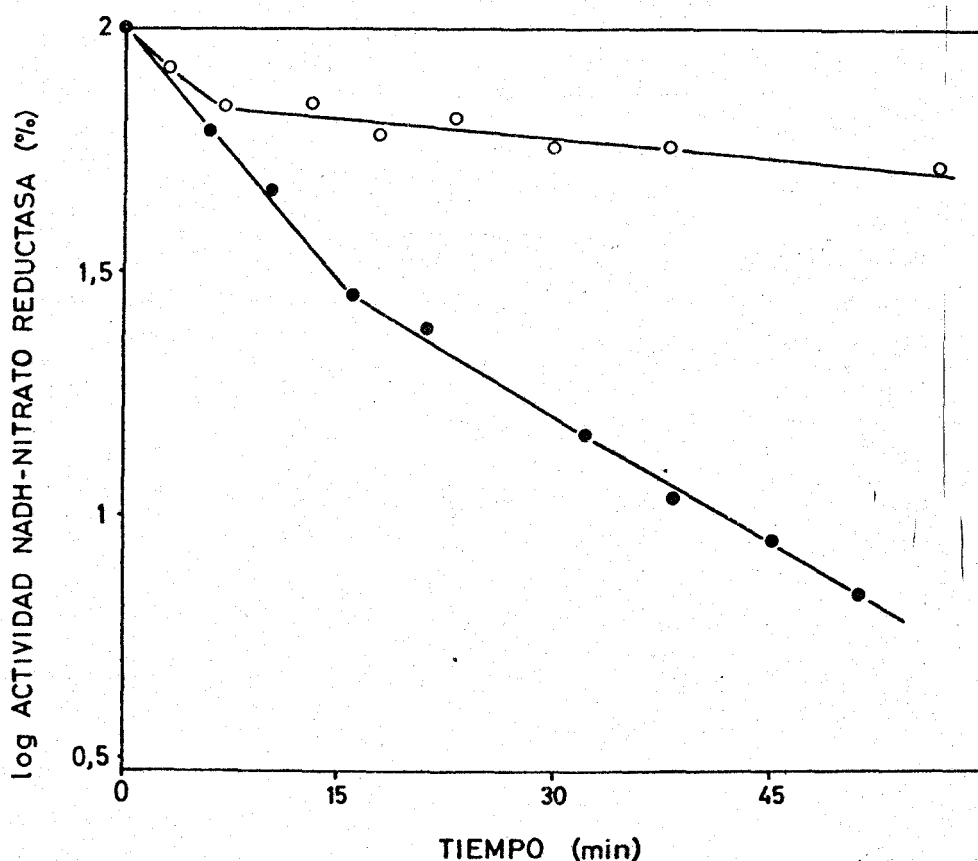


Fig 7. Cinética de la inactivación por NADH de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella* a distintos valores de pH.- La nitrato reductasa (0,25 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C con NADH 0,2 mM, FAD 10  $\mu$ M y 2(N-morfolín)-etano sulfonato sódico (pH 6,5) (o) ó Tris-ClH (pH 8,5) (●) 250 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de cada una de las mezclas de incubación a los tiempos indicados y se expresan como tantos por ciento de la del control sin NADH al correspondiente pH y a tiempo cero.

Tabla VI

EFFECTO DEL NADH SOBRE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella TRATADA CON PMB

Adición		Actividades relativas	
Tratamiento I	Tratamiento II	NADH-diaforasa	$\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
Ninguno	Ninguno	100	100
Ninguno	NADH	126	20
PMB	ANDH	6	60

La nitrato reductasa (1,5 mg/ml de preparación III) se incubó a 0°C durante 15 minutos en presencia de Tris-ClH 5 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu\text{M}$ , con y sin PMB 20  $\mu\text{M}$  (tratamiento I). Después del tratamiento I se añadió NADH 1 mM y se incubaron las mezclas a 45°C durante 7 minutos (tratamiento II). Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación después del tratamiento II.

NADH en una preparación sin tratar, comparado con la poca inactivación que produjo en una preparación tratada previamente con pMB.

### 3.2. Protección de la nitrato reductasa frente a la inactivación por piridín nucleótidos reducidos.

#### 3.2.1. Protección por nitrato.

La Tabla VII muestra que cuando el nitrato, que es un sustrato fisiológico de esta enzima, se encuentra presente en la mezcla de incubación, la inactivación no tiene lugar por NAD(P)H.

#### 3.2.2. Protección por NADP<sup>+</sup>.

El NADP<sup>+</sup>, pero no el NAD<sup>+</sup>, protege a la nitrato reductasa de Chlorella de la inactivación que producen sobre la FNH<sub>2</sub>-Nitrato reductasa tanto el NADH como el NADPH.

Tabla VII

**EFFECTO DEL NITRATO SOBRE LA INACTIVACION POR PIRIDIN  
NUCLEOTIDOS REDUCIDOS DE LA NITRATO REDUCTASA DE  
Chlorella**

Adición	Actividades relativas (%)	
	NADH-diaforasa	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa
Ninguna	80	75
NADH 0,6 mM	70	25
NADH 0,6 mM, NO <sub>3</sub> K 10 mM	88	75
NADPH 0,6 mM	32	16
NADPH 0,6 mM, NO <sub>3</sub> K 10 mM	90	70

La nitrato reductasa (0,9 mg/ml de preparación III) se incubó a 45°C durante 14 minutos en presencia de Tris-CIH 100 mM (pH 7,5) y FAD 10 µM, con los compuestos — que se indican en la tabla. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones incubado a 0-5°C.

Los resultados que se exponen en la Figura 8 muestran que la inactivación por NADH, así como por NADPH, no tuvo lugar cuando en la mezcla de incubación estaba presente el  $\text{NADP}^+$  a una concentración 10 veces mayor que la de NAD(P)H. El  $\text{NAD}^+$ , sin embargo, afectó solo ligeramente a la inactivación por NAD(P)H.

En el experimento cuyos resultados se muestran en la Tabla VIII se estudió el efecto inactivante de una mezcla de NADH y NADPH en la cual la concentración total de los dos nucleótidos era constante y se varió la proporción relativa de ambos. Como era de esperar (cf. Figura 4 y 5) la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa fué la misma en todos los casos. Sin embargo, al incluir  $\text{NADP}^+$  1 mM en la mezcla de incubación se observó que el efecto protector aumentaba a medida que era mayor la proporción de NADPH frente a NADH. A una concentración 2 mM el  $\text{NADP}^+$  protegió con igual efectividad a todas las mezclas. En la Tabla IX se observa que el  $\text{NAD}^+$ , incluso a concentraciones relativamente altas, no afectó en abso-

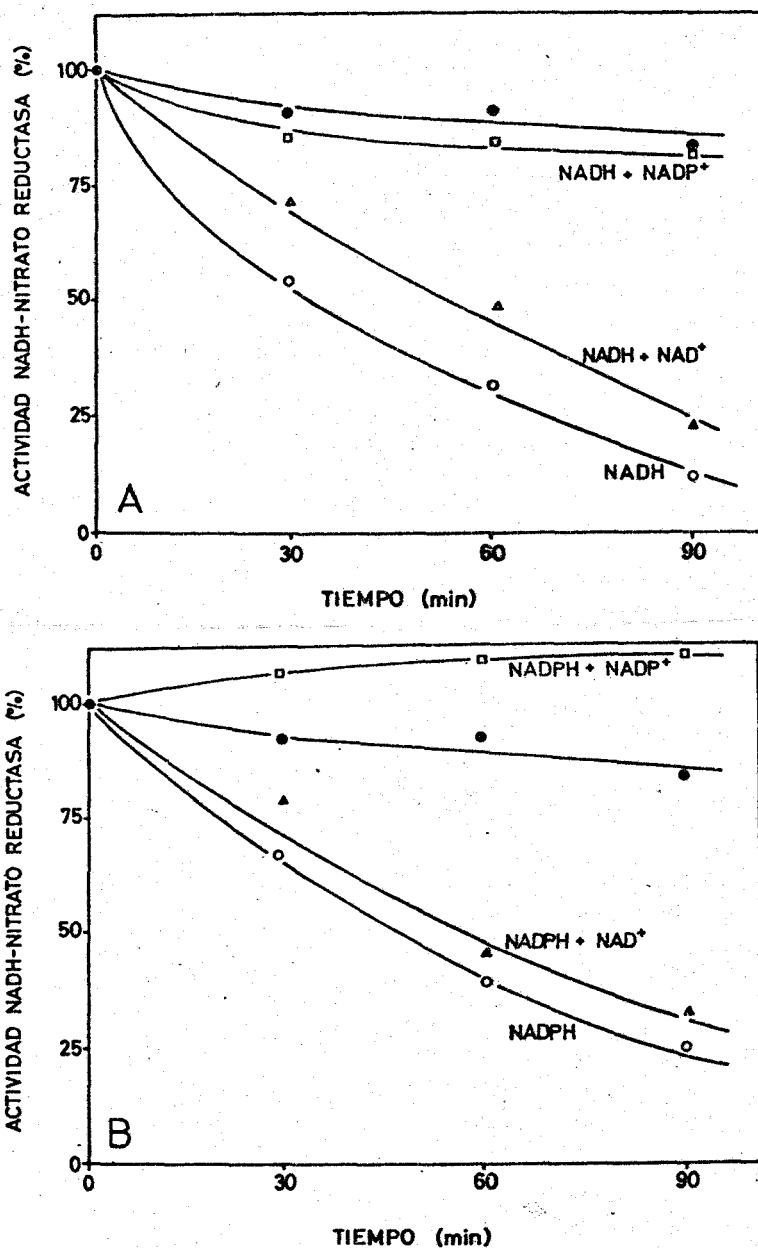


Fig 8. Protección por  $NADP^+$  de la inactivación de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella* por piridín nucleótidos reducidos.- La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C en presencia de Tris-ClH 100 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu$ M, con  $NAD(P)^+$  1 mM y  $NAD(P)H$  0,1 mM como se indica en la figura. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación a los tiempos que se indican y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

Tabla VIII

PROTECCION POR  $\text{NADP}^+$  DE LA INACTIVACION POR DISTINTAS  
 PROPORCIONES DE NADH Y NADPH DE LA NITRATO REDUCTASA  
 DE Chlorella

$\text{NADP}^+$ (mM)	Actividad $\text{NADH-NO}_3$ Raza (%)		
	$\frac{\text{NADH}}{\text{NADPH}} = 10$	$\frac{\text{NADH}}{\text{NADPH}} = 1$	$\frac{\text{NADH}}{\text{NADPH}} = \frac{1}{10}$
0	41	32	43
1	46	71	100
2	82	95	95

La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C durante 30 minutos en presencia de Tris-CIH 100 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu\text{M}$ , con distintas proporciones de NADH más NADPH (concentración total de piridín nucleótidos reducidos 0,1 mM) y  $\text{NADP}^+$  a las concentraciones que se indican. Después de la incubación se tomaron alícuotas de las correspondientes mezclas y se determinó la actividad, la cual se expresa como tanto por ciento de la del control sin adiciones a tiempo 0.

Tabla IX

EFFECTOS DE  $\text{NAD}^+$  Y  $\text{NADP}^+$  SOBRE LA INACTIVACION POR  $\text{NADH}$  DE  
LA  $\text{NADH-NITRATO REDUCTASA DE Chlorella}$

Adición	Actividad relativa $\text{NADH-NO}_3$ Raza
Ninguna	100
NADH 0,2 mM	33
" " , $\text{NAD}^+$ 4 mM	27
" " , $\text{NADP}^+$ 1 mM	60
" " , $\text{NADP}^+$ 1 mM, $\text{NAD}^+$ 4 mM	65
" " , $\text{NADP}^+$ 4 mM	92
" " , $\text{NADP}^+$ 4 mM, $\text{NAD}^+$ 6 mM	88

La nitrato reductasa (0,1 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C durante 2 h en presencia de Tris-ClH 100  $\mu\text{M}$  (pH 7,5) y FAD 10  $\mu\text{M}$  con los compuestos que se indican en la tabla. Después de la incubación la actividad enzimática se determinó en alícuotas de las mezclas de incubación.



luto a la protección por  $\text{NADP}^+$  de la inactivación por NADH.

En la Figura 9 se muestra el efecto de distintas concentraciones de  $\text{NADP}^+$  sobre la inactivación por NADH. El  $\text{NADP}^+$  protegió totalmente de la inactivación a concentraciones de 10 a 20 veces mayores que la de NADH. A concentraciones más bajas de  $\text{NADP}^+$  el efecto protector fué menor siendo nulo cuando la concentración de  $\text{NADP}^+$  fué igual a la de NADH.

#### *Efecto del $\text{NADP}^+$ sobre la reacción enzimática.*

Cuando el NADH actúa como donador de electrones para la reducción del nitrato a través de la reacción catalizada por la NADH-nitrato reductasa, la velocidad de la reacción es totalmente independiente de la presencia en la mezcla de reacción de  $\text{NADP}^+$ , incluso a concentraciones elevadas. Se midió la velocidad de reducción de nitrato con NADH a concentraciones de 10, 20 y 50  $\mu\text{M}$  (la  $K_m$  para NADH es aproximadamente 15-20  $\mu\text{M}$ ), y se observó que ésta era la misma en presencia y en ausencia de  $\text{NADP}^+$ , incluso a una concentra-

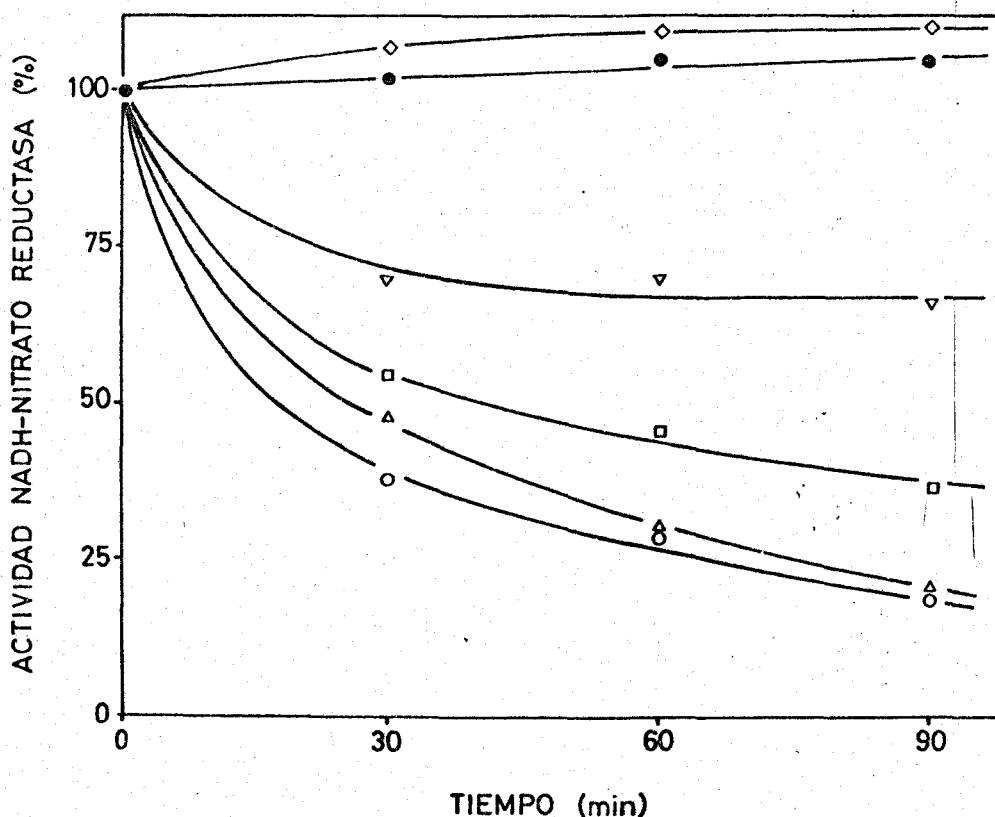


Fig 9. Efecto de la concentración de  $\text{NADP}^+$  sobre la inactivación de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella* por NADH.- La nitrato reductasa (0,1 mg/ml de preparación IV) se incubó a  $25^\circ\text{C}$  en presencia de Tris-ClH 100 mM (pH 7,5) y FAD  $10\ \mu\text{M}$ , con NADH (signos vacíos), o sin él (●), y  $\text{NADP}^+$  a las siguientes concentraciones: 0 (o), 0,1 ( $\Delta$ ), 0,4 ( $\square$ ), 2,0 ( $\nabla$ ) y 4,0 ( $\diamond$ ) mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación a los tiempos que se indican y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

ción de este compuesto 1 mM.

### **3.2.3. Protección por $\text{NADP}^+$ de la inactivación producida por NADH más cianuro.**

La inactivación de la  $\text{FNN}_2$ -nitrate reductasa por NADH tiene lugar de una forma mucho más rápida cuando se encuentra presente el cianuro a muy baja concentración (1  $\mu\text{M}$ ) (20). El  $\text{NADP}^+$  también muestra un efecto protector frente a este tipo de inactivación, como se observa en la Figura 10. Como en la inactivación por NADH solo, el  $\text{NAD}^+$  no produjo ningún efecto sobre la inactivación en presencia de cianuro.

### **3.2.4. Protección por otros compuestos fosforilados.**

En la Tabla X se muestra que, tanto el derivado mono como el difosforilado de la ribulosa protegen frente a la inactivación por NADH, mientras que la ribulosa no produce ningún efecto. El AMP presenta también un efecto protector notable, pero no la adenosina, que es un análogo estructural sin el grupo fosfato. El CoA, sin embargo no muestra efecto protector, mientras que el fosfato por

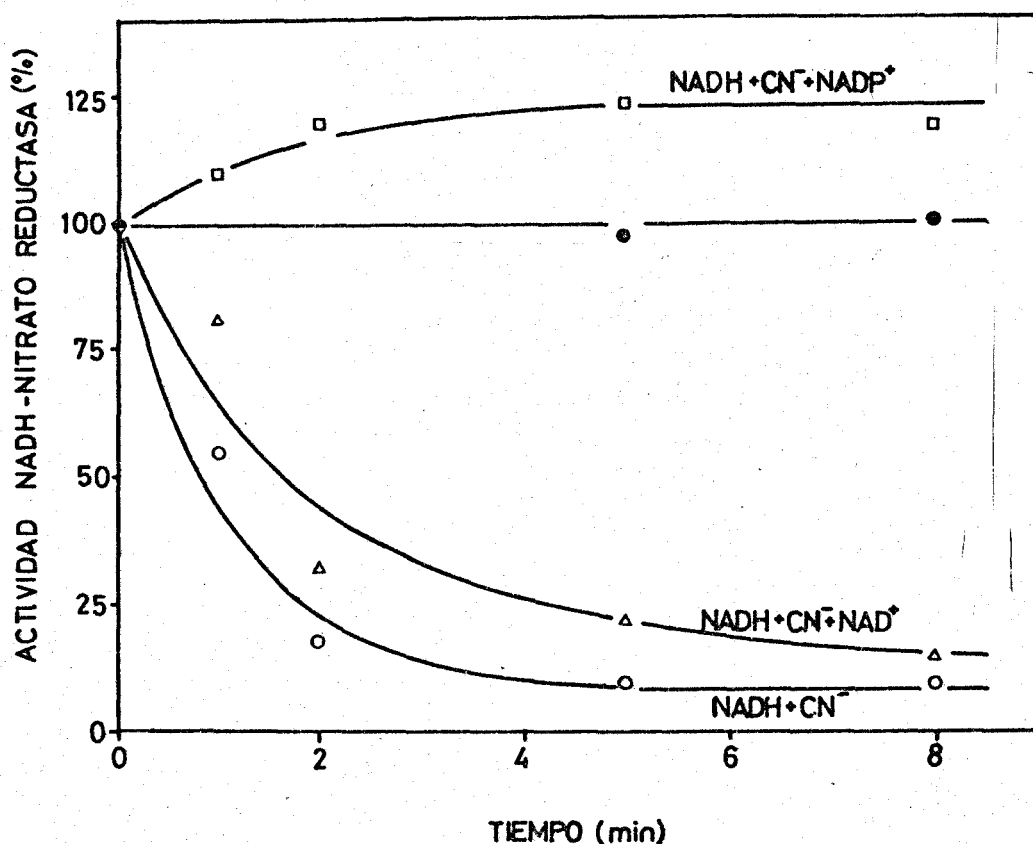


Fig 10. Protección por  $NADP^+$  de la inactivación de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella* por NADH más cianuro. — La nitrato reductasa (0,4 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C en presencia de Tris-ClH 100 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu$ M (●), y además con NADH 50  $\mu$ M más cianuro potásico 1  $\mu$ M (signos vacíos) y  $NAD(P)^+$  3 mM como se indica en la figura. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

Tabla X

**EFFECTO DE CIERTOS COMPUESTOS POSFORILADOS SOBRE LA  
INACTIVACION POR NADH DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA  
DE Chlorella**

Adición	Actividad relativa (%) NADH-NO <sub>3</sub> Redu
Ninguna	97
NADH 0,1 mM	6
" " , Adenosina 1 mM	14
" " , AMP 1 mM	82
" " , CoA 1 mM	7
" " , Ribulosa 1 mM	10
" " , Ribulosa 5-P 1 mM	60
" " , Ribulosa 1,5 dIP 1 mM	68
" " , Fosfato 10 mM	25

La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C durante 1 h en presencia de Tris-CIN 100 mM (pH 7,5) FAD 10 µM con los compuestos que se indican en la tabla. Después de la incubación, la actividad enzimática se determinó en alícuotas de cada una de las mezclas de incubación y se expresa, como tanto, por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

el solo, tiene un efecto protector apreciable.

### 3.3. Reactivación de la nitrato reductasa inactivada por piridín nucleótidos reducidos.

La nitrato reductasa de Chlorella fusca inactivada in vitro por piridín nucleótidos reducidos puede recuperar su actividad mediante tratamiento con distintos agentes oxidantes.

#### 3.3.1. *Reactivación espontánea.*

Una reactivación parcial, aunque muy lenta, se consigue exponiendo al aire el enzima inactivo una vez eliminado el exceso de reductor por paso a través de una columna de Sephadex G-25. Probablemente esta reactivación sea debida a la acción oxidante del oxígeno atmosférico.

#### 3.3.2. *Reactivación durante el ensayo de la actividad.*

La nitrato reductasa inactivada por NADH se reactiva durante el ensayo de su actividad en presencia de nitrato. En el experimento que se muestra en la Figura 11 se ensayó la actividad de un enzima que habfa sido previamente inactivado por NADH. Al principio del ensayo la actividad era muy baja, pero durante el transcurso de éste aumentó hasta llegar a ser cinco veces mayor que la inicial.

### 3.3.3. *Reactivación por ferricianuro.*

El agente reactivante más eficaz de los ensayados es el ferricianuro, que produce una reactivación rápida y prácticamente completa de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa inactivada previamente con NAD(P)H (Tablas V y XI).

*Eliminación del agente inactivante y efecto del ferricianuro sobre la nitrato reductasa inactivada por NADH.* El experimento de la Tabla XI muestra que si, una vez que el enzima ha sido inactivado por NADH, se elimina éste de la mezcla de incubación, pasándola a través de una columna de Sephadex G-25, no se recupera inmediatamente la actividad, mientras que la incubación con ferri-

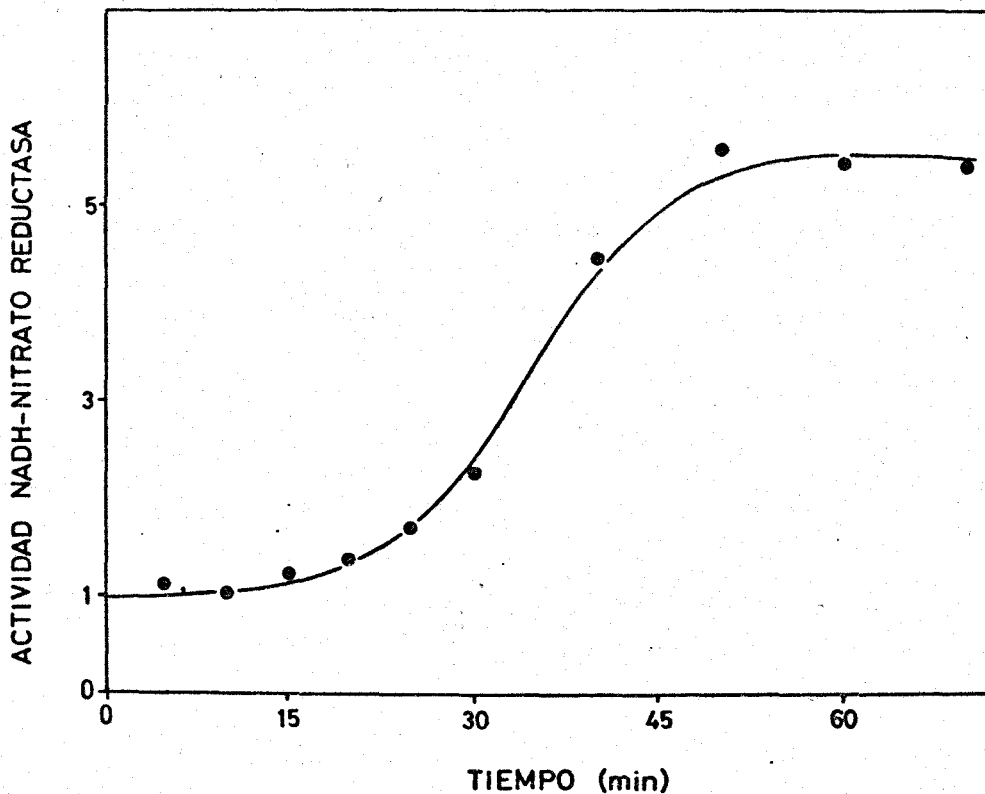


Fig 11. Reactivación de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella* durante el ensayo de la actividad.- La mezcla de ensayo contenía nitrato reductasa inactiva (0,1 mg/ml), — NADH 1 mM,  $\text{NO}_3\text{K}$  20 mM y Tris-ClH 150 mM (pH 7,5). El enzima inactivo se obtuvo incubando la nitrato reductasa (1,5 mg/ml de preparación IV) a 25°C durante 1 h en presencia de Tris-ClH 150 mM (pH 8,5), FAD 10  $\mu\text{M}$  y NADH 0,3 mM. La actividad enzimática se determinó en la mezcla de ensayo a lo largo de los primeros 70 minutos de la reacción y se expresa en unidades arbitrarias.



Tabla XI

REACTIVACION POR FERRICIANURO DE LA NITRATO REDUCTASA DE  
Chlorella INACTIVADA CON NADH

Preparación	Actividad relativa NADH-NO <sub>3</sub> Rasa
A) Nitrato reductasa	100
B) Preparación A más NADH	6
C) Preparación B después de pasada por Sephadex G-25	8
D) Preparación C incubada con ferricianuro	93

La nitrato reductasa (3 mg/ml de preparación III), preparación A, se incubó a 25°C durante 1 h en presencia de Tris-ClH 50 mM (pH 7,5), FAD 10  $\mu$ M y NADH 0,6 mM (preparación B). Para la obtención de la preparación C se utilizó una columna de 1,5 cm de  $\phi$  x 10 cm de altura equilibrada con Tris-ClH 50 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu$ M (se corrigió el efecto de la dilución que se produce al atravesar la columna, determinando la proteína). La preparación C se incubó con ferricianuro 0,3 mM durante 2 minutos a 0°C (preparación D). La actividad enzimática se determinó en una alícuota de cada una de las preparaciones, inmediatamente después de su obtención.

**cianuro la devuelve de nuevo casi hasta su valor original, lo cual sugiere que el fenómeno de inactivación va acompañada de una modificación química del complejo enzimático.**

#### 4. INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca Y Spinacea oleracea POR TIOLES

##### 4.1. Inactivación de la nitrato reductasa por tioles.

##### 4.1.1. *Efecto de los tioles sobre las tres actividades del complejo enzimático.*

La actividad  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa de Chlorella, así como la de espinaca, es sensible al tratamiento con tioles simples. En la Tabla XII se muestra el efecto del DTE y el mercaptoetanol sobre las tres actividades del complejo. Vemos que ambos tioles producen una pérdida muy acusada de la actividad  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa y, por tanto, de la  $\text{NADH}$ -nitrato reductasa, mientras que la  $\text{NADH}$ -diaforasa no se inactiva por este tratamiento, sino que, por el contrario, es protegida frente a la inactivación espontánea. El efecto protector de los tioles sobre la actividad diaforásica no es sorprendente ya que ésta es sensible al tratamiento con reactivos del grupo  $-\text{SH}$  y a la oxidación (15).

Tabla XII

EFFECTO DE LOS TIOLLES SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA  
DE Chlorella

Adición	Actividades relativas (%)				
	NADH-NO <sub>3</sub> Redu		FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Redu		NADH-diaforasa
	Tratado con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		Tratado con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		
Ninguna	96	80	97	95	85
DTE	14	64	33	75	98
2-Mercaptoetanol	19	77	33	55	100

La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C durante 150 minutos en presencia de Tris-ClH 250 mM (pH 7,5) y PAD 10 µM, con los compuestos que se indican en la tabla a las siguientes concentraciones: DTE 10 mM y 2-mercaptoetanol 50 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron después de la incubación en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación, y se expresan como tantos por ciento de las del control sin adiciones a tiempo cero.

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

Tabla XIII

EFFECTO DE LOS TIOLES SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA

Adición	Actividades relativas (%)			
	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa	FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa	Tratado con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> <sup>a</sup>	
Ninguna	87	90	91	100
DTE	38	46	89	100
2-Mercaptoetanol	13	13	38	113
Tioglicolato sódico	24	45	63	113

La nitrato reductasa (0,2 mg/ml) se incubó a 25°C durante 135 min en presencia de Tris-ClH 50 mM (pH 7,5), ClNa 0,2 M y FAD 10 µM con los compuestos que se indican en la tabla a las siguientes concentraciones: DTE 10 mM, 2-mercaptoetanol y tioglicolato sódico 50 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron después de la incubación en alícuotas de las correspondientes mezclas y se expresan como tantos por ciento de las del control sin adiciones a tiempo cero.

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

Los tioles producen en espinaca la inactivación de la  $\text{FNN}_2$ -nitrato reductasa de una forma semejante a la encontrada en el enzima de Chlorella fusca (Tabla XIII). La diaforasa de espinaca es protegida también por tioles de la inactivación espontánea.

#### 4.1.2. Efecto de distintas concentraciones de DTE sobre la inactivación.

La Figura 12 muestra la cinética de inactivación de la NADH-nitrato reductasa de Chlorella a distintas concentraciones de DTE. Para obtener inactivación la concentración de DTE debe ser mayor de 5 mM. A concentraciones más bajas de este compuesto se observó protección, e incluso aumento de actividad, debido probablemente al efecto del tior sobre la NADH-diaforasa. Un hecho digno de destacarse es la obtención de "plateaus" a distintos niveles de actividad dependiendo de la concentración inicial de DTE, los cuales quizá sean debidos a la disminución de la concentración de DTE durante el tiempo de incubación, probablemente por oxidación del tior. La representación

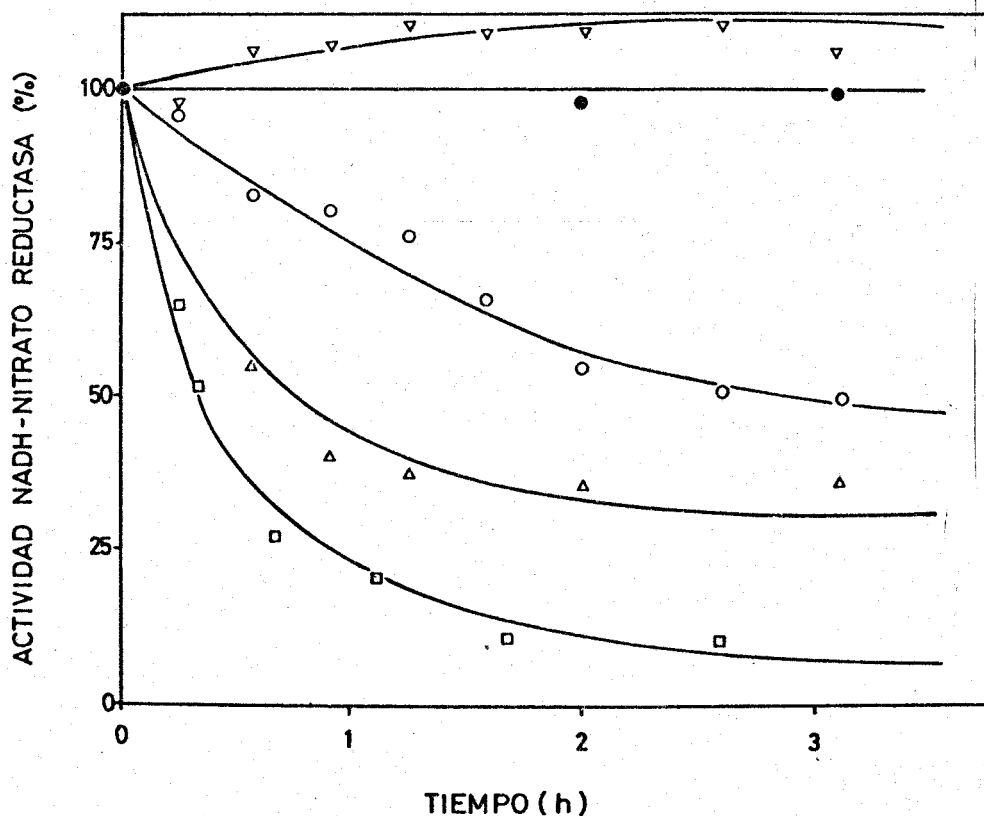


Fig 12. Efecto de la concentración de DTE en la inactivación de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*.— La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a — 25°C con Tris-ClH 200 mM (pH 7,5), FAD 10  $\mu$ M y DTE a las siguientes concentraciones: 0 (●), 5 (▽), 10 (○), 20 (△) y 50 (□) mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación a los tiempos indicados y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

semilogarítmica de la primera parte de la inactivación produce líneas rectas (Figura 13), las cuales indican que el proceso de inactivación sigue una cinética de pseudo-primer orden.

Resultados semejantes a los de Chlorella se obtuvieron con el enzima de espinaca (Figura 14), aunque en este caso la inactivación se alcanza a concentraciones más bajas de DTE, probablemente porque al determinar la actividad  $\text{FNH}_2$ -nitrate reductase el efecto protector y reactivador del DTE sobre la NADH-diaforasa no se manifiesta.

#### 4.1.3. Efecto del pH en la inactivación por DTE.

Para estudiar la influencia del pH sobre la velocidad de inactivación por DTE, se incubó la nitrato reductase de Chlorella con una concentración fija de DTE a distintos valores de pH y se midió la actividad de cada una de las mezclas a los 30 minutos de incubación. La Figura 15 muestra que la velocidad de inactivación por DTE aumenta de una forma muy marcada al aumentar el pH, habiendo además



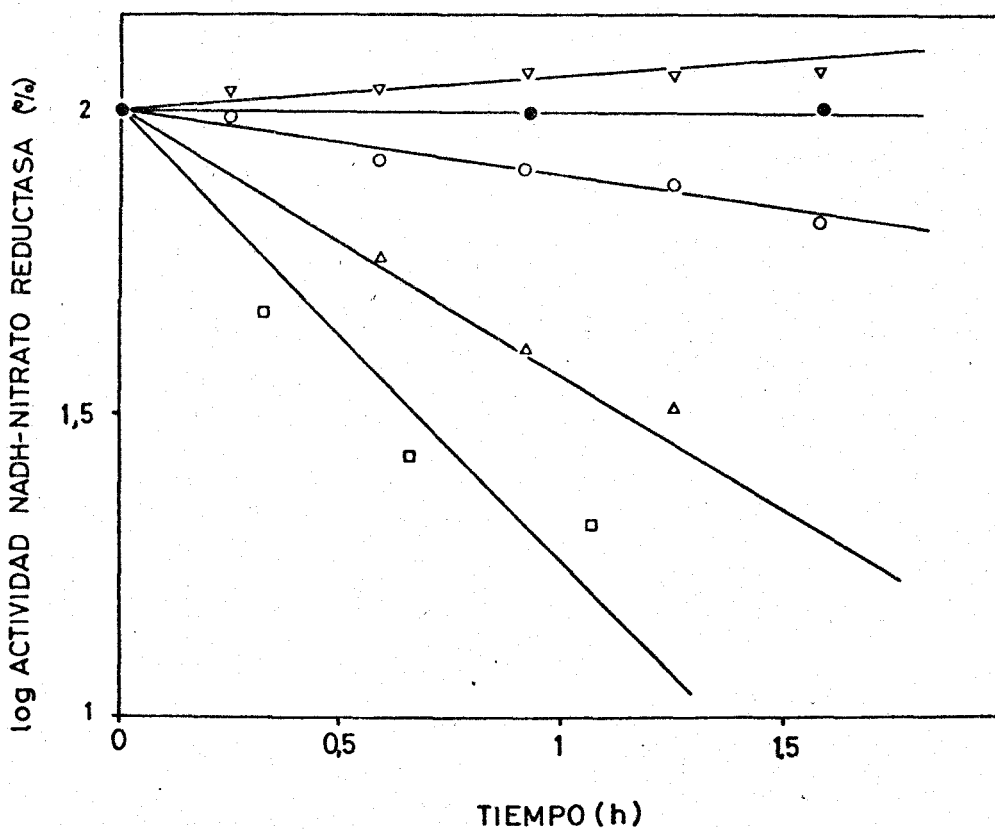


Fig 13. *Cinética de la inactivación de la NADH-nitrato reductasa de Chlorella por distintas concentraciones de DTE.- Representación semilogarítmica de los datos de la Figura 12.*

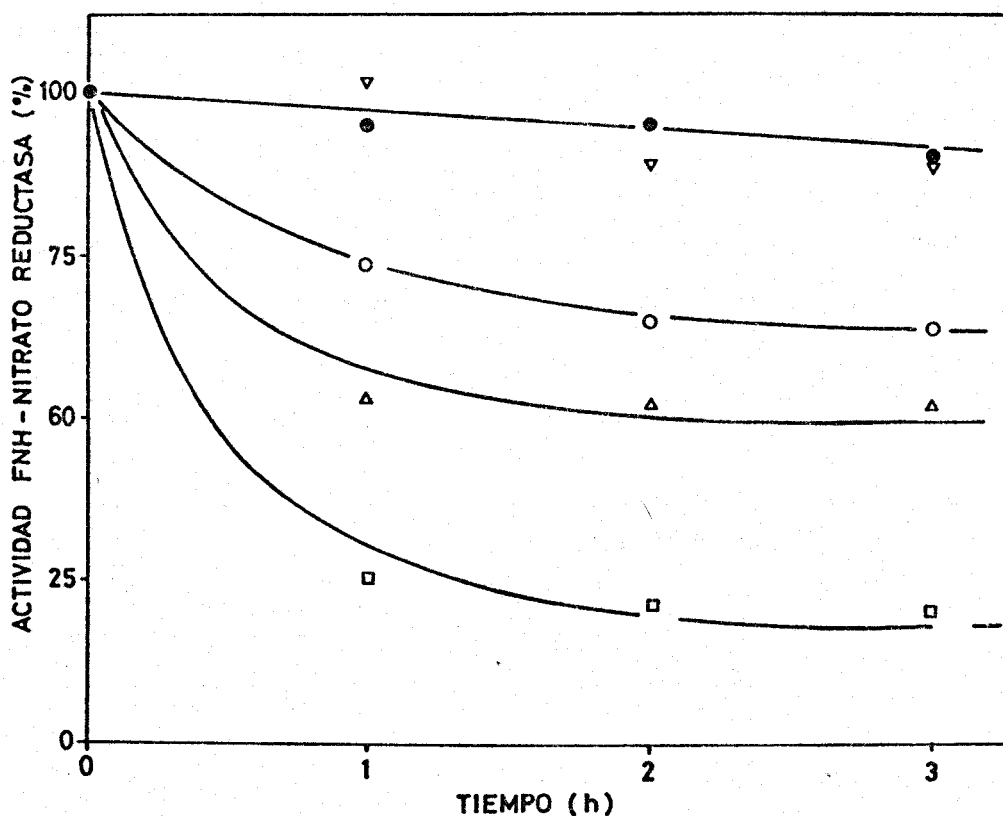


Fig 14. Efecto de la concentración de DTE en la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa de espinaca.- La nitrato reductasa (0,8 mg/ml) se incubó a  $25^\circ\text{C}$  con Tris-ClH 200 mM (pH 7,5), ClNa 0,1 M, FAD 10  $\mu\text{M}$  y DTE a las siguientes concentraciones: 0 (●), 1 (▽), 5 (○), 10 (△) y 20 (□) mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

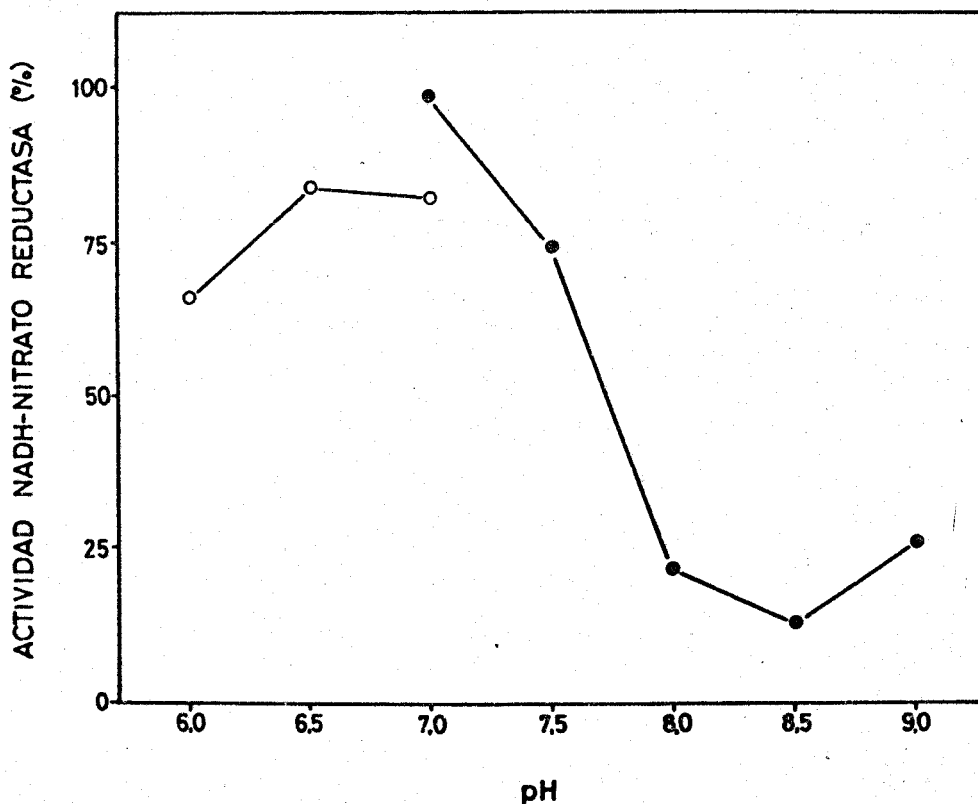


Fig 15. Efecto del pH en la inactivación por DTE de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella*.—La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a 30°C durante 1 h con FAD 10  $\mu$ M, DTE 10 mM y fosfato potásico (o) ó Tris-ClH (●) 300 mM, a los valores de pH que se indican. Después de la incubación la actividad enzimática se determinó en alícuotas de cada una de las mezclas y se expresa como tantos por cientos de la del control sin DTE al correspondiente pH.

un cambio en la velocidad de inactivación entre un valor de pH de 7,0 y 8,0. Esta dependencia del pH es parecida a la de la inactivación por NADH (Figura 6).

Por otra parte se midió la velocidad de reducción por DTE del enlace -S-S- de la cistina, en función del pH y se obtuvo (Figura 16) una dependencia del pH semejante a la encontrada en el caso de la inactivación de la nitrato reductasa por NADH y por DTE.

Al incubar el enzima solo a distintos valores de pH (Figura 17) se encontró una ligera disminución en la estabilidad al aumentar el pH. También se observó que la estabilidad del enzima en un tampón de fosfato potásico es mayor que en uno de Tris-ClH del mismo pH.

#### 4.1.4. Efecto del $\text{NAD}^+$ en la inactivación por DTE.

Como hemos descrito en el apartado 4.1.2., al incubar nitrato reductasa de Chlorella o espinaca con concentraciones no muy altas de DTE, después de un periodo inicial

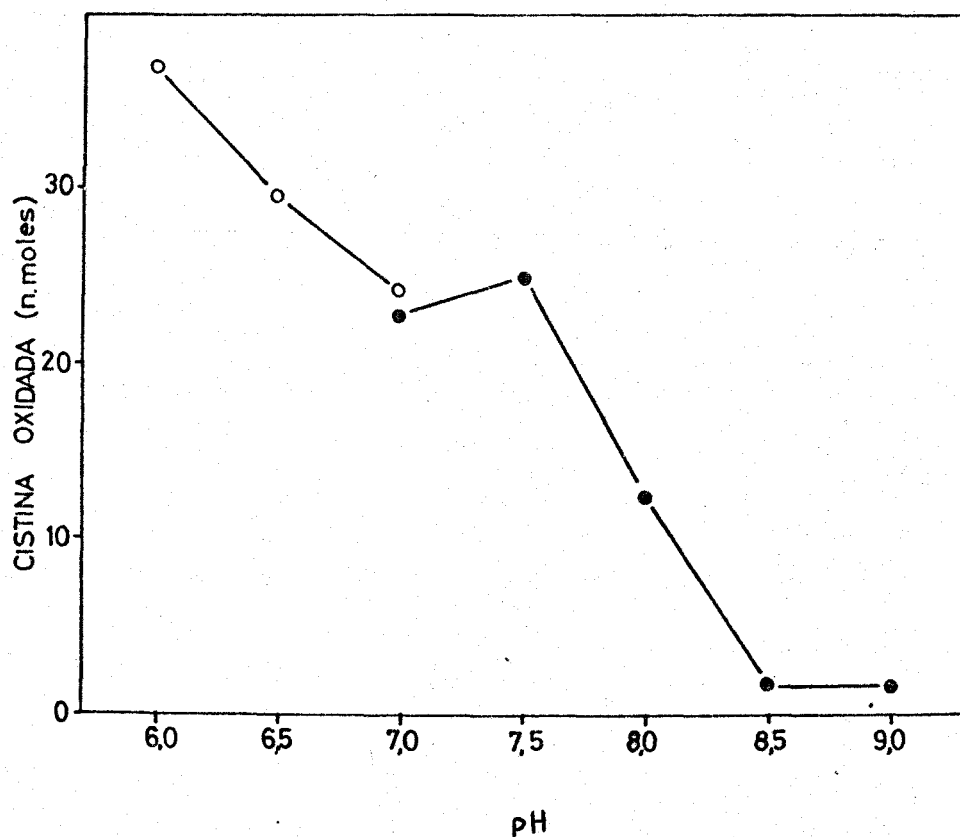


Fig 16. Efecto del pH sobre la velocidad de reducción de la cistina por DTE.- Las mezclas de incubación, que contenían fosfato potásico (o) ó Tris-ClH (●) 300 mM, cistina 40  $\mu$ M y DTE 100  $\mu$ M se incubaron a 30°C durante 15 minutos. Al término de la incubación se valoró la cisteína formada como se describe en Materiales y Métodos.

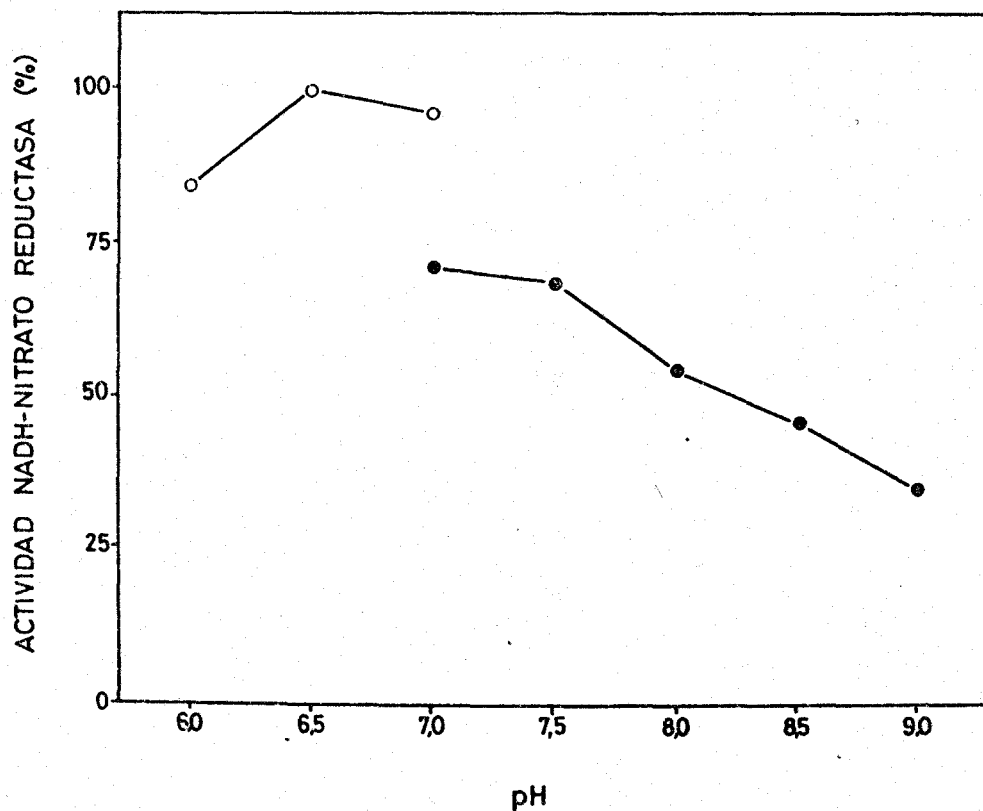


Fig 17. Estabilidad de la NADH-nitrato reductasa de *Chlorella* a distintos valores de pH.- La nitrato reductasa (0,2 mg/ml de preparación IV) se incubó a 30°C durante 1 h en presencia de FAD 10  $\mu$ M y fosfato potásico (o) ó Tris-ClH (●) 300 mM a los valores de pH que se indican. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de cada una de las mezclas y se expresan como tanto por ciento de la del control al correspondiente pH a tiempo cero.

de inactivación, la actividad se estabiliza a un cierto nivel, que depende de la concentración inicial de DTE. Si a una preparación incubada con DTE, y cuya actividad se haya estabilizado a un cierto nivel, se le añade  $\text{NAD}^+$ , se produce un descenso adicional de actividad (Figura 18). Ahora bien, si antes de la adición de  $\text{NAD}^+$ , la preparación anterior se pasa a través de una columna de Sephadex G-25, para eliminar el exceso de tior, no se observa inactivación, a menos que se agregue de nuevo DTE, lo cual indica que la inactivación adicional que produce el  $\text{NAD}^+$  requiere la presencia de DTE.

La Tabla XIV muestra el resultado de incubar la nitrato reductasa de Chlorella con DTE y además  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . Se observa que, mientras que el  $\text{NAD}^+$  produjo un incremento muy significativo de la inactivación producida por DTE, el  $\text{NADP}^+$  no mostró este efecto. Los piridín nucleótidos oxidados, por sí solos, no tienen ningún efecto sobre la actividad. La inactivación por  $\text{NADH}$  y  $\text{NADPH}$  se incluye en la tabla como comparación.

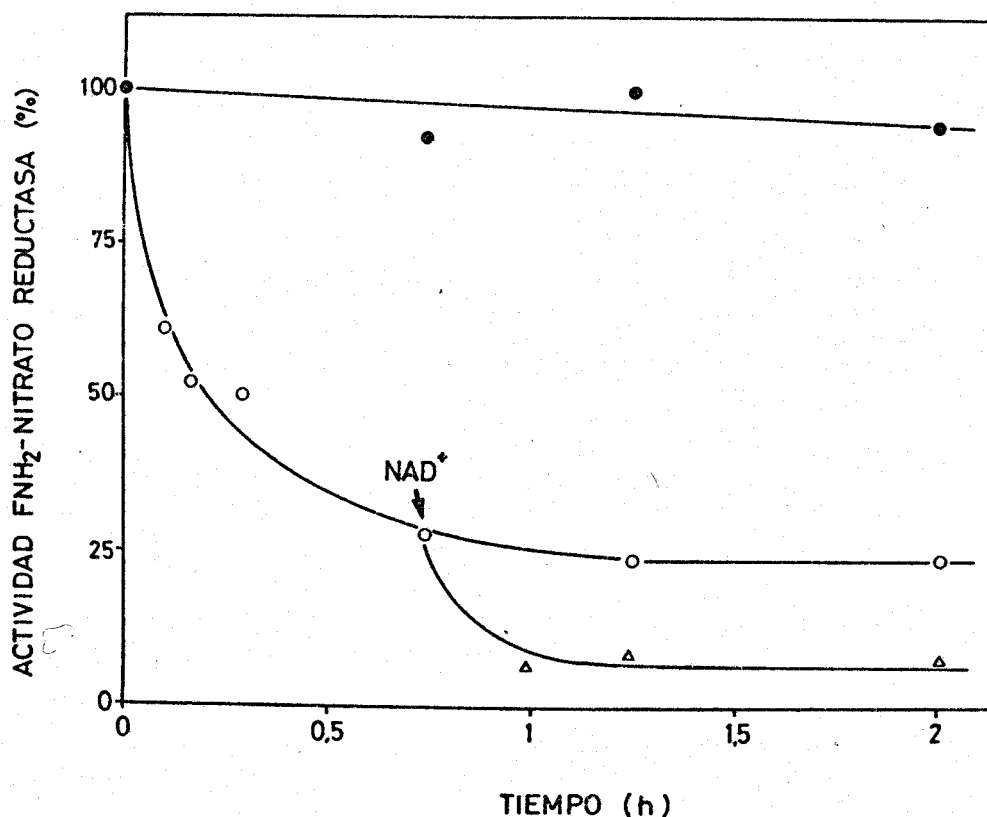


Fig 18. Efecto del  $NAD^+$  sobre la inactivación por DTE de la  $FNH_2$ -nitrato reductasa de *Chlorella*.—La nitrato reductasa (1 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C en presencia de Tris-ClH 70 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu$ M, con DTE 10 mM (o) y sin él (●). A los 45 minutos se añadió  $NAD^+$  hasta 0,5 mM a una porción de la mezcla con DTE ( $\Delta$ ). La actividad enzimática se determinó en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación y se expresa como tanto por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.



Tabla XIV

EFFECTO DEL  $\text{NAD}^+$  SOBRE LA INACTIVACION POR DTE DE LA  
 $\text{FNH}_2$ -NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2$ - $\text{NO}_3$ Raza
Ninguna	100
DTE 10 mM	79
DTE 10 mM, $\text{NAD}^+$ 0,5 mM	30
DTE 10 mM, $\text{NADP}^+$ 0,5 mM	77
$\text{NAD}^+$ 0,5 mM	108
$\text{NADP}^+$ 0,5 mM	98
$\text{NADH}$ 0,5 mM	46
$\text{NADPH}$ 0,5 mM	38

La nitrato reductasa (0,8 mg/ml de preparación IV) se incubó a  $25^\circ\text{C}$  durante 1 h en presencia de Tris-CIN 80 mM (pH 7,5). FAD  $10\ \mu\text{M}$ , con los compuestos que se indican en la tabla. Después de la incubación se determinó la actividad enzimática en alícuotas de las mezclas de incubación.

Resultados semejantes a los anteriores se obtuvieron utilizando el enzima de espinaca (Tabla XV).

**4.1.5. Inactivación por DTE y por DTE más  $NAD^+$  de una preparación de nitrato reductasa desprovista de actividad  $NADH$ -diaforasa.**

En la Figura 19 se muestran los efectos producidos por el DTE y el DTE más  $NAD^+$  sobre las actividades enzimáticas de una nitrato reductasa de espinaca intacta (izquierda) y una nitrato reductasa del mismo origen desprovista de la actividad  $NADH$ -diaforasa (derecha). Esta actividad diaforásica se eliminó por calentamiento a  $45^{\circ}C$  durante 7 minutos. Las actividades  $NADH$ - y  $FNH_2$ -nitrato reductasa de la preparación intacta disminuyeron por efecto del DTE hasta un 50 % de las actividades iniciales, así como la  $FNH_2$ -nitrato reductasa de la preparación calentada, la cual, al no tener actividad  $NADH$ -diaforasa, carecía también de  $NADH$ -nitrato reductasa. Sin embargo el efecto del  $NAD^+$  potenciando la inactivación por DTE se produjo sobre la nitrato reductasa intacta, pero no sobre la carente de actividad diaforásica. Estos resultados indican que para que se produz-

Tabla XV

EFFECTO DEL  $\text{NAD}^+$  SOBRE LA INACTIVACION POR DTE DE LA  
 $\text{FNH}_2$ -NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2$ - $\text{NO}_3$ Rasa
Ninguna	100
DTE 10 mM	53
DTE 10 mM, $\text{NAD}^+$ 0,5 mM	8
DTE 10 mM, $\text{NADP}^+$ 0,5 mM	46
$\text{NAD}^+$ 0,5 mM	97
$\text{NADP}^+$ 0,5 mM	92

La nitrato reductasa (0,2 mg/ml) se incubó a 25°C durante 2 h en presencia de Tris-ClH 50 mM (pH 7,5), FAD 10  $\mu\text{M}$  y ClNa 0,2 M, con los compuestos que se indican en la tabla. Después de la incubación se determinó la actividad enzimática en alícuotas de las mezclas de incubación.

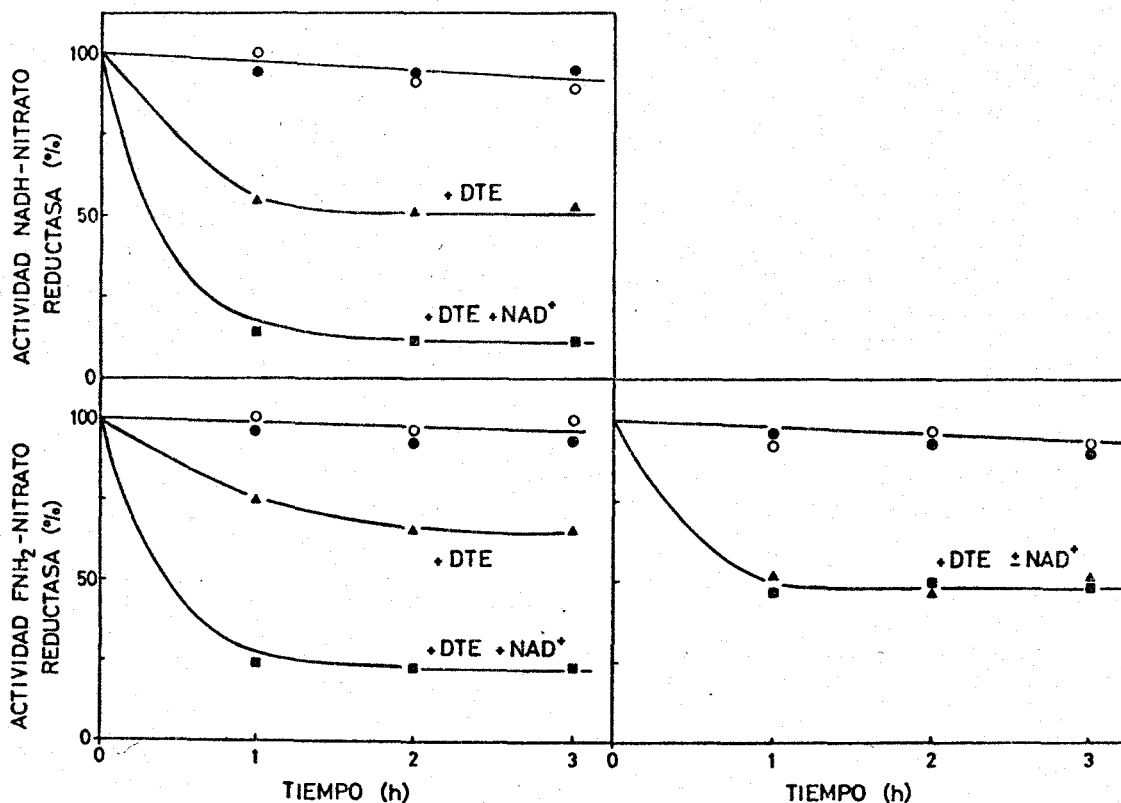


Fig 19. Efecto del  $NAD^+$  sobre la inactivación por DTE de distintas preparaciones de espinaca.- La nitrato reductasa intacta (0,2 mg/ml), izquierda, y nitrato reductasa carente de actividad diaforásica (0,2 mg/ml), derecha, se incubaron a 25°C en presencia de Tris-ClH 500 mM (pH 7,5), FAD 10  $\mu$ M (o) y además de los siguientes compuestos:  $NAD^+$  0,5 mM ( $\bullet$ ), DTE 10 mM ( $\Delta$ ) y DTE 10 mM más  $NAD^+$  0,5 mM ( $\blacksquare$ ). La preparación carente de actividad diaforásica se preparó incubando nitrato reductasa (1 mg/ml) en presencia de Tris-ClH 50 mM (pH 7,5) a 45°C durante 7 minutos. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación a los tiempos indicados y se expresan como tantos por ciento de la del correspondiente control sin adiciones a tiempo cero.

ca inactivación por DTE no se requiere que la NADH-diaforasa sea funcional, pero sí para que se manifieste el efecto potenciador de la inactivación del  $\text{NAD}^+$ .

#### 4.2. Protección de la nitrato reductasa frente a la inactivación por tioles.

##### 4.2.1. *Protección por nitrato*

El nitrato protege de la inactivación por DTE de la  $\text{FMN}_2$ -nitrato reductasa de Chlorella fusca. En la Tabla XVI se observa que el nitrato protegió a la nitrato reductasa de Chlorella tanto de la inactivación por DTE sólo como de la producida por DTE más  $\text{NAD}^+$ . En el caso de la nitrato reductasa de espinaca, el nitrato abolió el efecto potenciador del  $\text{NAD}^+$  sobre la inactivación por DTE, pero produjo un efecto pequeño o nulo sobre la inactivación producida por DTE solo (Tabla XVII).

Tabla XVI

EFFECTO DEL NITRATO SOBRE LA INACTIVACION POR DTE DE LA  
 $\text{FNH}_2$ -NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2$ - $\text{NO}_3$ Reda
Ninguna	100
DTE 10 mM	26
DTE 10 mM, $\text{NO}_3\text{K}$ 10 mM	85
DTE 10 mM $\text{NAD}^+$ 0,5 mM	19
DTE 10 mM, $\text{NAD}^+$ 0,5 mM, $\text{NO}_3\text{K}$ 10 mM	88

La nitrato reductasa (0,7 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C durante 6 h en presencia de Tris-ClH 100 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu\text{M}$  con los compuestos que se indican en la tabla. Después de la incubación, las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones.

Tabla XVII

**EFFECTO DEL NITRATO SOBRE LAS INACTIVACIONES POR NADPH  
Y POR DTE DE LA F<sub>NH</sub><sub>2</sub>-NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA**

Adición	Actividad relativa F <sub>NH</sub> <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rase
Ninguna	100
DTE 10 mM	37
DTE 10 mM, NO <sub>3</sub> K 10 mM	50
DTE 10 mM, NAD <sup>+</sup> 0,5 mM	7
DTE 10 mM, NAD <sup>+</sup> 0,5 mM, NO <sub>3</sub> K 10 mM	41

La nitrato reductasa (0,2 mg/ml) se incubó a 25°C durante 5 h en presencia de Tris-ClH 50 mM (pH 7,5), ClNa 0,2 M y FAD 10 µM, con los compuestos que se indican en la tabla. Después de la incubación se determinó la actividad en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación.

### 4.3. Reactivación de la nitrato reductasa inactivada por tioles.

#### 4.3.1. *Reactivación espontánea.*

La exposición al aire durante 3-4 horas del enzima inactivo produjo un incremento considerable de la actividad, de un modo semejante al descrito para el enzima inactivado por piridín nucleótidos reducidos.

#### 4.3.2. *Reactivación por ferricianuro.*

Las nitrato reductasas de Chlorella y espinaca inactivadas por tioles se reactivan por ferricianuro de una forma semejante a la de los enzimas inactivados por piridín nucleótidos reducidos. Las Tablas XII y XIII muestran la reactivación por ferricianuro de preparaciones que habían sido previamente inactivadas con tioles. En estos experimentos fué preciso añadir una cantidad elevada de ferricianuro para oxidar el exceso de tioles presente en la mezcla de incubación. Este exceso de ferricianuro probablemente produjo la inactivación de la diaforasa, sobre todo en el caso del



enzima de espinaca, lo cual explica el que no se consiguiese reactivación por ferricianuro de la NADH-nitrato reductasa de espinaca.

#### 4.3.3. *Reactivación por otros agentes.*

Después de pasar la preparación inactivada por tiorles a través de una columna de Sephadex G-25 para eliminar el exceso de reactivo, se intentó la reactivación del enzima con algunos reactivos químicos como son el  $I_2$  a una concentración 50  $\mu M$ ;  $Cl_2Hg$ , 1,5  $\mu M$ ;  $AsO_2Na$ , 0,1 mM y o-iodosobenzoato sódico hasta 10 mM. Todos estos reactivos han sido descritos como capaces de unir grupos -SH próximos, bien por oxidación, bien por formación de un puente del tipo -S-M-S-. También se intentó la reactivación con  $NAD^+$ ,  $NADP^+$ , ADP, ATP y nitrato. En ningún caso se obtuvo una reactivación comparable a la que produce el ferricianuro, y únicamente se observó un ligero aumento de actividad con el nitrato.

## 5. INACTIVACION REVERSIBLE DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella fusca POR SULFITO.

### 5.1. Inactivación de la nitrato reductasa por sulfito.

#### 5.1.1! *Efecto del sulfito sobre las tres actividades del complejo enzimático.*

El sulfito, que es un reactivo de grupos disulfuro (91) se comporta también como un agente inactivante de la nitrato reductasa de Chlorella. El efecto de este reactivo sobre las tres actividades del complejo enzimático se muestra en la Tabla XVIII donde puede observarse que, tanto la actividad  $\text{FMN}_2$ -nitrato reductasa como la NADH-nitrato reductasa se inactivan parcialmente por sulfito, mientras que la NADH-diaforasa se protege por este tratamiento. La inactivación por el sulfito es mucho más lenta que las producidas por los piridín nucleótidos reducidos y por los tioles y que se necesita incubar el enzima con este reactivo durante 7 horas para obtener un 90 % de inactivación (Figura 20).

Tabla XVIII

EFFECTO DEL SULFITO SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO NADH-NITRATO REDUCTASA  
DE Chlorella

Adición	Actividades relativas (%)				
	NADH-NO <sub>3</sub> Raza		FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Raza		NADH-diaforasa
	Tratado con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		Tratado con Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> *		
Ninguna	72	-	90	-	66
SO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	23	65	30	61	105

La nitrato reductasa (0,5 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C durante 5 h en presencia de Tris-ClH 250 mM (pH 7,5) y FAD 10 µM, con sulfito sódico 10 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron después de la incubación, en alícuotas de las correspondientes mezclas y se expresan como tantos por ciento de las del control sin adiciones a tiempo cero.

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

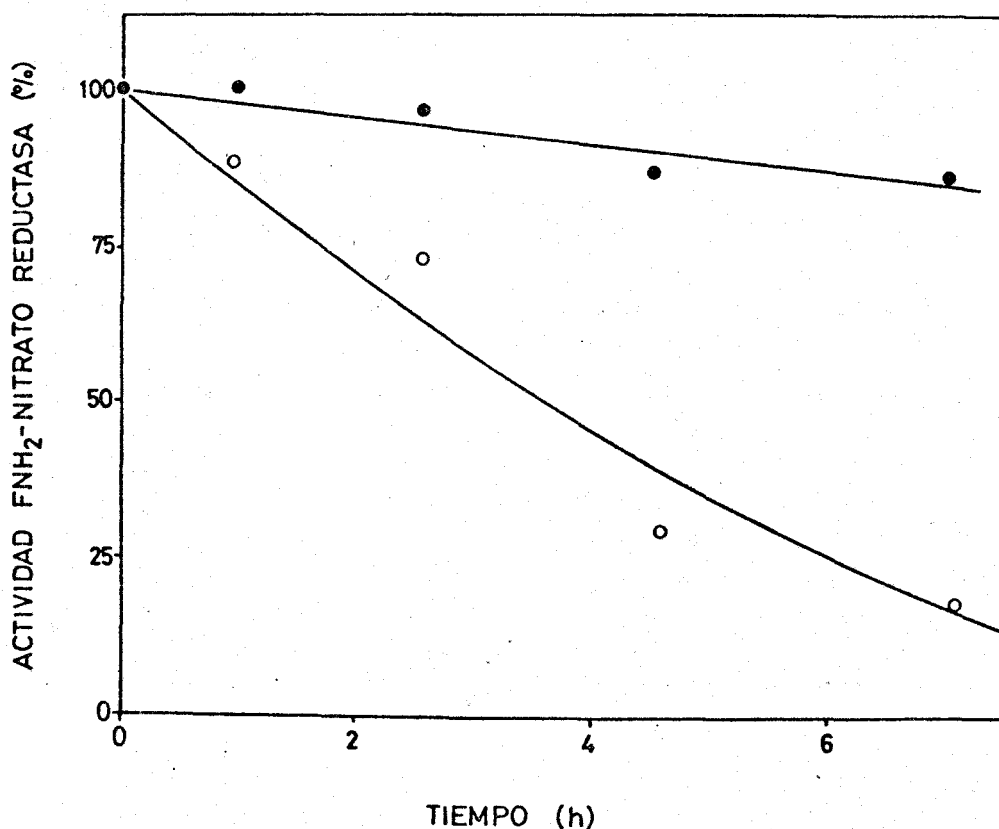


Fig 20. *Inactivación por sulfito de la FNH<sub>2</sub>-nitrate reductasa de Chlorella.*— La nitrato reductasa (0,5 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C en presencia de Tris-ClH 250 mM (pH 7,5) y FAD 10 μM, con sulfito sódico 10 mM (o) o sin él (●). Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación y se expresan como tantos por ciento de la del control sin adiciones a tiempo cero.

### 5.1.2. Efecto del $\text{NAD}^+$ en la inactivación por sulfito.

El  $\text{NAD}^+$  parece potenciar la inactivación por sulfito de la nitrato reductasa (Tabla XIX) como en el caso de la inactivación por DTE.

## 5.2. Protección de la nitrato reductasa frente a la inactivación por sulfito.

### 5.2.1. Protección por nitrato.

El nitrato protege de la inactivación que provoca el sulfito sobre la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa (Tabla XIX) de una forma semejante a la encontrada en las inactivaciones por  $\text{NAD(P)H}$  y tioles (Tablas VII, XVI y XVII).

## 5.3. Reactivación de la nitrato reductasa inactivada por sulfito.

### 5.3.1. Reactivación por ferriocianuro.

Como en las otras inactivaciones estudiadas, el

Tabla XIX

EFFECTOS DEL NITRATO Y  $\text{NAD}^+$  SOBRE LA INACTIVACION POR SULFITO DE LA  $\text{FNH}_2$ -NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2$ - $\text{NO}_3$ Redase
Ninguna	100
$\text{SO}_3\text{Na}_2$ 10 mM,	19
$\text{SO}_3\text{Na}_2$ 10 mM, $\text{NO}_3\text{K}$ 10 mM	56
$\text{SO}_3\text{Na}_2$ 10 mM, $\text{NAD}^+$ 0,5 mM	8

La nitrato reductasa (0,8 mg/ml de preparación IV) se incubó a 25°C durante 7 h en presencia de Tris-CIH 100 mM (pH 7,5) y FAD 10  $\mu\text{M}$ , con los compuestos que se indican en la tabla. Después de la incubación, se determinaron las actividades enzimáticas en alícuotas de las correspondientes mezclas de incubación.

ferrocianuro reactiva a la nitrato reductase inactivada por sulfito (Tabla XVIII).

#### IV. DISCUSSION



La reducción y ulterior asimilación de las formas oxidadas del carbono, nitrógeno y azufre constituyen rutas metabólicas peculiares de las plantas y organismos verdes. Los mencionados compuestos inorgánicos son reducidos para su incorporación en material celular utilizando agua como donador de electrones y luz como fuente de energía. Aparentemente el control de estos procesos no depende de la razón ATP/ADP, es decir, del estado energético de la célula, sino más bien de la proporción relativa entre piridín nucleótidos reducidos y oxidados. (102).

Al pasar de la luz a la oscuridad, o viceversa, se produciría un cambio en el estado de oxido-reducción de la célula, que controlaría la proporción entre las formas activas y las inactivas de los mencionados enzimas interconvertibles.

El complejo enzimático nitrato reductasa estudiado

en el presente trabajo, cataliza el primer paso en la reducción asimilatoria del nitrato, y parece estar controlado por un mecanismo de interconversión entre una forma oxidada y activa y otra reducida e inactiva. Este tipo de interconversión respondería al plan general de regulación de los enzimas asimilatorios discutidos, que hemos visto que dependen del estado redox de la célula.

Las nitrato reductasas de diversos orígenes se sabía que eran sensibles al reactivo de grupos sulfhidrilo pMB (18-20). No obstante, en los experimentos citados, se añadía el reactivo directamente a la mezcla de ensayo, por lo cual no se podía distinguir entre inhibición e inactivación. Nosotros hemos incubado el enzima de Chlorella con pMB durante distintos tiempos, antes del ensayo de actividad, que se realiza en una mezcla prácticamente desprovista de pMB libre (Tabla II). Los resultados así obtenidos muestran que el pMB ejerce un efecto inactivante sobre la nitrag

to reductasa como consecuencia de la modificación de sus grupos sulfhidrilo, ya que la adición de tioles sencillos a una preparación enzimática inactivada por el pMB produce su reactivación (Figura 2). Otro reactivo de grupos -SH, la NEM, produjo también inactivación del enzima (Tabla III). La actividad NADH-diaforasa se mostró mucho más sensible a la inactivación por los dos reactivos usados que la FMN<sub>2</sub>-nitrato reductasa. Lo mismo que de la inactivación por pMB (18,20), el NADH, pero no el NADPH, NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>, protege de la inactivación que produce la NEM (Tabla IV), lo cual parece indicar que los dos reactivos se unen al mismo o los mismos grupos sulfhidrilo para dar lugar a la inactivación.

La mayor parte de las deshidrogenasas dependientes de piridín nucleótidos reducidos se inactivan mediante tratamiento con reactivos del grupo sulfhidrilo (79,92). En muchos casos, la presencia del piridín nucleótido, sustrato del enzima, impide que la inactivación tenga lugar, por lo que se ha sugerido que el grupo o los grupos sulfhidrilo responsables de la inactivación podrían estar localizados en el sitio de unión para el piridín nucleótido. Apoya esta localización de los grupos citados el que, al parecer, un grupo -SH intervie-

ne en el mecanismo de catálisis de tres deshidrogenasas (93-95). Por todo ello, es razonable pensar que el NADH ejercería su efecto protector de la nitrato reductasa al unirse al enzima en el sitio que contiene el grupo o los grupos sulfhidrilo responsables de la inactivación, aunque no puede eliminarse el que los grupos sulfhidrilo citados estuviesen localizados en un sitio diferente y pasasen a ser inaccesibles a los reactivos como consecuencia de un cambio en la conformación del enzima producida por el NADH.

Nuestra preparación parcialmente purificada de nitrato reductasa se inactiva por NAD(P)H, pero no por NAD(P)<sup>+</sup> (Tabla V y Figuras 4 y 5), y se reactiva por ferricianuro, pero no por ferrocianuro (Tabla VI). La eliminación del NADH libre de la preparación incubada con este compuesto no produce reactivación (Tabla XI), lo cual indica que el piridín nucleótido reducido ha modificado químicamente al enzima. Sin embargo, si esta preparación se mantiene durante varias horas en presencia de oxígeno atmosférico, se produce una reactivación parcial. El ferricianuro, en cambio, causa la reactivación prácticamente completa e instantánea del complejo enzimático.

Vennesland y sus colaboradores han estudiado la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris, la cual se obtiene inactiva en el extracto crudo y se reactiva durante el proceso de purificación (29). Este grupo de investigadores ha logrado recientemente la reactivación del enzima en el extracto crudo por tratamiento con ferricianuro, y más lentamente por el oxígeno atmosférico (40). Su preparación purificada y activa como la nuestra, se inactiva por NAD(P)H y se reactiva por ferricianuro. Además, la inactivación por NAD(P)H se acelera por adición de un componente celular de peso molecular comprendido entre 1,000 y 10,000 daltons, el cual se separa de la nitrato reductasa por filtración (96).

Nuestros resultados y los anteriormente expuestos indican que la inactivación por NAD(P)H de la nitrato reductasa se debe a una reducción de este complejo enzimático, y la reactivación a una oxidación.

Resulta sorprendente que sea el mismo sustrato que proporciona los electrones para la reducción del nitrato, el NADH, el que provoque la inactivación del enzima. Sin embargo, hay dos hechos que indican que únicamente se produce la inac-

tivación del enzima en determinadas circunstancias ambientales. Por un parte, la concentración de NADH necesaria para la reducción enzimática del nitrato es muy baja ( $K_m$  igual a 10-15  $\mu\text{M}$ ), mientras que para producir inactivación la concentración de este piridín nucleótido debe ser mayor (aproximadamente 100  $\mu\text{M}$ ). Además, en presencia de nitrato la inactivación no tiene lugar (Tabla VII). Por todo ello la inactivación de la nitrato reductasa sólo se produciría a una concentración de NADH alta y en ausencia de nitrato, condición esta última en la cual no sería de ninguna utilidad la existencia de un enzima inactivo.

El NADPH, que no actúa como donador de electrones para la reducción enzimática del nitrato, inactiva a la nitrato reductasa con la misma eficacia que el NADH (Figura 4 y 5). Esta distinta especificidad observada para los fenómenos de reducción enzimática del nitrato e inactivación del enzima, podría ser un reflejo de la distinta especificidad in vivo de los dos procesos: el NADH para la reducción del nitrato, y el NADPH para la inactivación.

Los tioles producen una inactivación de las nitrato reductasas de Chlorella fusca y Spinacea oleracea que tienen

muchos puntos de semejanza con la obtenida con piridín nucleótidos reducidos (Tablas XII y XIII). En los dos casos se inactiva la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa, sin que disminuya la actividad NADH-diaforasa, y en los dos casos, el nitrato protege de la inactivación (Tablas XVI y XVII), y el ferricianuro reactiva la preparación inactivada (Tablas XII y XIII). Además, tanto con tioles como con piridín nucleótidos reducidos, la velocidad de inactivación muestra una dependencia semejante del pH (cf. Figuras 6, 15 y 16).

El efecto inactivante de los tioles simples sobre la nitrato reductasa de Chlorella fusca que se describe en este trabajo está aparentemente en desacuerdo con resultados obtenidos recientemente por Salomonson et al (96). Según estos autores, ni el glutatión reducido, ni la cisteína, ni el DTE, producen inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris. Esta discrepancia podría deberse a diferencias entre su preparación y la nuestra, ya que incluso distintas preparaciones de nitrato reductasa de Chlorella fusca obtenidas de la misma forma se inactivan en diferentes grados (80). Además, los autores citados no especifican la concentración de tioles usada en sus experimentos, y nuestros resultados muestran que la inactivación por tioles es muy sensible a la concentración

de éstos: a concentraciones de DTE menores de 3 mM no se observa inactivación.

Como se ha indicado en la "Introducción", los tioles y el sulfito son reactivos específicos de los puentes disulfuro en las proteínas simples (71,74,79). Sin embargo, las nitrato reductasas estudiadas no son proteínas simples, sino flavomolibdoproteínas que tal vez contengan también citocromo (97).

La reactivación de la nitrato reductasa inactivada por tioles se consigue con ferricianuro, que es un reactivo que oxida a los grupos tiólicos para producir puentes disulfuro (74). Sin embargo, otros reactivos que han sido descritos como formadores de puentes disulfuro a partir de grupos -SH, no han producido reactivación, como tampoco lo ha producido el arsenito, reactivo que liga dos grupos sulfhidrilo con la formación de un puente estable (Apartado 4.3.3). Esto se explica si tenemos en cuenta que los supuestos grupos -SH que han de formar el puente pertenecen a una proteína y pueden no ser accesibles a determinados reactivos, o bien la conformación de la proteína puede no ser la adecuada en presencia de estos últimos para la formación del puente.



X  
A pesar de que es preciso un estudio más detallado para obtener resultados conclusivos, es razonable admitir como hipótesis más probable que los tioles producen la inactivación de la nitrato reductasa por reducción de uno o varios puentes disulfuro, y que la reactivación que produce el ferricianuro sea debida a la formación de los citados puentes por oxidación de los correspondientes grupos sulfhidrilo.

El nitrato podría ejercer su efecto protector al mantener oxidados los grupos cuya reducción se acompaña de inactivación, o bien al impedir el acceso a los citados grupos o al estabilizar una conformación activa del complejo. La reactivación por nitrato estaría en favor de la primera explicación del efecto protector; sin embargo, aunque la nitrato reductasa inactivada se reactiva durante el ensayo de la actividad, en presencia de nitrato, y otros autores han descrito la reactivación por nitrato solo, nosotros no hemos observado nunca este efecto en ausencia de nitrato (Figura 11). Por otra parte la protección por nitrato de la inactivación por DTE (Tablas XVI y XVII), a pesar de que este ditioi no es donador de electrones para la reducción del nitrato, parece oponerse a que sea responsable del efecto protector

una oxidación producida por este sustrato.

Cuando la primera actividad parcial del complejo, la NADH-diaforasa de Chlorella fusca, ha sido previamente inactivada con PMB, el efecto inactivante del NADH sobre la  $\text{FMN}_2$ -nitrato reductasa es muy pequeño (Tabla VI), de lo cual se concluye que la inactivación por NADH requiere la existencia de una porción diaforásica activa. Este requerimiento ha sido estudiado con mayor detalle en nuestro Departamento, utilizando nitrato reductasa de espinaca (Fig. 19), con resultados parecidos. En contraste con la inactivación con NAD(P)H, la inactivación por tioles de la nitrato reductasa de espinaca no requiere la presencia de una diaforasa funcional, lo cual indica que probablemente estos compuestos actúan sobre grupos disulfuro de la porción  $\text{FMN}_2$ -nitrato reductasa, y no a través de la diaforasa, como parecen hacerlo los piridín nucleótidos reducidos.

La diferencia de especificidad para los piridín nucleótidos reducidos de la catálisis enzimática y la inactivación, puede deberse a la existencia en el complejo de dos sitios distintos de unión para piridín nucleótidos: uno sería

el sitio activo de la NADH-diaforasa, y el otro tendría una función reguladora. La protección por  $\text{NADP}^+$ , y no por  $\text{NAD}^+$ , de la inactivación que produce el  $\text{NAD(P)H}$ , y la falta de efecto de este compuesto sobre la actividad enzimática, indicarían su unión al sitio regulador y no al catalítico. Por otra parte, el  $\text{NAD}^+$ , que ejerce un efecto sinérgico en la inactivación por tioles del cual carece el  $\text{NADP}^+$ , se uniría al sitio catalítico y no al regulador.

El proceso de inactivación por piridín nucleótidos reducidos de las nitrato reductasas estudiadas constituye, al parecer, un mecanismo para la regulación fisiológica de la actividad del complejo enzimático. Es probable que los piridín nucleótidos reducidos inactiven a la nitrato reductasa al producir la misma modificación química que los tioles, esto es, al abrir por reducción puentes disulfuro del complejo. La reactivación se produciría al reformarse los citados puentes por oxidación de los grupos sulfhidrilo correspondientes. Este mecanismo de regulación pertenecería al grupo de las interconversiones por reducción de puentes disulfuro a grupos sulfhidrilo. En este tipo de interconversión se han incluido tentativamente toda una serie de enzi-

mas, la nitrato reductasa es, a nuestro parecer, de los que tienen más probabilidades de presentar la interconversión mencionada. La mayoría de los otros enzimas se inactivan por oxidación de los grupos -SH y se inactivan por reducción, lo cual es un fenómeno bastante generalizado e inespecífico, que se debe al hecho de que los restos de cisteína se encuentran en general en los enzimas intracelulares en su forma reducida. Al oxidar estos grupos, se cambia la estructura del enzima, y como consecuencia de este cambio, en muchos casos se pierde la actividad, la cual se suele recuperar por reducción con tioles. En el caso de la nitrato reductasa, la forma oxidada es la activa y la reducida la inactiva, y por ello es probable que el puente disulfuro, poco frecuente en la arquitectura de enzimas intracelulares, tenga alguna función específica, que podría ser de carácter regulador.

El requerimiento de una porción diaforásica funcional para que se produzca inactivación de la  $\text{DNH}_2$ -nitrato reductasa por  $\text{NAD(P)H}$ , podría explicarse si la  $\text{NADH}$ -diaforasa, u otra proteína relacionada con ella en el complejo, actuase como enzima regulador para reducir, utilizando  $\text{NAD(P)H}$  como donador de electrones, un puente disulfuro localizado proba-

bientemente en la porción  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa del complejo. Hay toda una serie de enzimas que, utilizando como donador de electrones piridín nucleótidos reducidos, reducen puentes disulfuro de moléculas simples o complejas (98-100), y el postulado enzima regulador pertenecería a esta clase de enzimas.

La inactivación por tioles, en cambio, no requiere la existencia de una porción diaforásica funcional, lo cual se debería a su actuación directa sobre los puentes disulfuro, y no a través del enzima regulador, como el  $\text{NAD(P)H}$ .

Aunque toda una serie de compuestos, muchos de ellos no fisiológicos, protegen a la nitrato reductasa de la inactivación por  $\text{NAD(P)H}$ , de los piridín nucleótidos oxidados, el  $\text{NADP}^+$ , pero no el  $\text{NAD}^+$ , es efectivo como agente protector. El  $\text{NADP}^+$ , a concentraciones intermedias, presenta un mayor efecto protector de la inactivación por  $\text{NADPH}$  que de la producida por  $\text{NADH}$  (Tabla VIII). La especificidad de la protección puede deberse a la existencia de un sitio de unión para los piridín nucleótidos, de función reguladora, el cual podría ser in vivo específico para  $\text{NADPH}$  y  $\text{NADP}^+$ , como se ha propuesto anterior-

mente. Si esto es así, los compuestos anteriores serían los responsables de que la nitrato reductasa se encontrase en forma activa o inactiva, sin que el propio sustrato de la reducción del nitrato, el NADH actuase como agente inactivante. En relación con el proceso de inactivación in vivo, hay que tener en cuenta el posible efecto potenciador del ADP postulado por Losada (101).

De la reactivación in vivo se conoce muy poco. Podría ser el nitrato sólo, o junto con el NADH, el agente reactivante, o bien podría la reactivación estar catalizada por un enzima que haya sido eliminado durante la purificación.

A pesar de que es mucho lo que se ha aprendido en los últimos años acerca de la interconversión estudiada, todavía será necesario un mayor conocimiento del detalle químico del proceso, de la estructura y composición del complejo enzimático, así como de los mecanismos que actúan in vivo antes de que se tenga una visión clara del proceso y de sus consecuencias en la regulación de la nitrato reductasa.

## **V. CONCLUSIONES**

- 1.- Los reactivos del grupo sulfhidrilo p-hidroxi-mercuribenzoato (pMB) y N-etil-maleimida (NEM) inactivan el complejo enzimático nitrato reductasa de Chlorella fusca. La actividad parcial NADH-diaforasa es mucho más sensible a estos reactivos que la  $\text{FHN}_2$ -nitrato reductasa.
- 2.- El NADH, pero no el NADPH, el  $\text{NADP}^+$  o el  $\text{NAD}^+$ , protege a la NADH-diaforasa de la inactivación por NEM.
- 3.- Los tioles simples reactivan a la nitrato reductasa inactivada por pMB.
- 4.- El NADH y el NADPH inactivan el complejo nitrato reductasa de Chlorella fusca: producen la inactivación de la  $\text{FHN}_2$ -nitrato reductasa, y como consecuencia de la NADH-nitrato reductasa, pero no de la NADH-diaforasa.
- 5.- Si la NADH-diaforasa del complejo enzimático se inactiva previamente con pMB, los piridín nucleótidos reducidos apenas producen inactivación de la  $\text{FHN}_2$ -nitrato reductasa. Esto indica que la inactivación por NADPH de la  $\text{FHN}_2$ -nitrato reductasa requiere la presencia de una NADH-diaforasa funcional en el complejo.



- 6.- El nitrato y el  $\text{NADP}^+$ , pero no el  $\text{NAD}^+$ , protegen a la nitrato reductasa de la inactivación por  $\text{NAD(P)H}$ .
- 7.- La nitrato reductasa inactivada por  $\text{NAD(P)H}$  se reactiva por ferricianuro y también durante el ensayo de la actividad  $\text{NADH}$ -nitrato reductasa, en presencia de nitrato y  $\text{NADH}$ .
- 8.- Los tioles simples, como los piridín nucleótidos reducidos, inactivan a las nitrato reductasas de Chlorella fusca y Spinacea oleracea: producen inactivación de la  $\text{FMN}_2$ -nitrato reductasa, y como consecuencia de la  $\text{NADH}$ -nitrato reductasa, pero no de la  $\text{NADH}$ -diaforasa.
- 9.- El  $\text{NAD}^+$ , pero no el  $\text{NADP}^+$ , potencia el efecto inactivante de los tioles.
- 10.- La inactivación por tioles de la nitrato reductasa de Spinacea oleracea no se afecta si inactiva previamente por calentamiento la  $\text{NADH}$ -diaforasa, pero el efecto potenciador del  $\text{NAD}^+$  desaparece.
- 11.- El nitrato protege a la nitrato reductasa de la inactivación por tioles.

- 12.- La nitrato reductasa inactivada por tioles se reactiva por ferricianuro.
- 13.- El sulfito inactiva a la nitrato reductasa de Chlorella fusca: produce inactivación de la  $\text{FNN}_2$ -nitrato reductasa, y como consecuencia de la NADH-nitrato reductasa, pero no de la NADH-diaforasa.
- 14.- El nitrato protege a la nitrato reductasa de la inactivación por sulfito.
- 15.- La nitrato reductasa inactivada por sulfito se reactiva por ferricianuro.
- 16.- La inactivación por piridín nucleótidos reducidos y tioles tiene características muy semejantes, y al parecer van acompañadas de la misma modificación química del enzima.
- 17.- La modificación química que acompaña a la inactivación consiste en una reducción, y la que acompaña a la reactivación en una oxidación. Probablemente sean puentes disulfuro los que se reducen durante la inactivación pasando a grupos sulfhidrilo, y éstos se oxidan durante la re-

activación pasando a puentes disulfuro.

- 18.- Esta interconversión entre una forma oxidada y activa de la nitrato reductasa y otra reducida e inactiva, parece constituir un mecanismo de regulación del complejo enzimático in vivo.
- 19.- Apparentemente existen dos sitios de unión diferentes para los piridín nucleótidos: uno de ellos sería el sitio catalítico al que se uniría el NADH para la reducción del nitrato, y el otro sería un sitio regulador, al que se unirían el NADH o NADPH para inactivar por reducción a la nitrato reductasa.
- 20.- La porción NADH-diaforasa, u otra proteína relacionada con ella en el complejo, contendría el sitio de unión para los piridín nucleótidos llamado regulador, y podría actuar como enzima regulador de la interconversión.
- 21.- Parece probable que las concentraciones relativas de NADPH y  $\text{NADP}^+$  sean las que controlen in vivo el estado funcional del complejo nitrato reductasa.

**VI. BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. NICHOLAS, D.J.D. y A. NASON. Diphosphopyridine nucleotide-nitrate reductase from Escherichia coli. J. Bacteriol., 69, 580-583 (1955).
2. TANIGUCHI, S. y K. OHNACHI. Particulate nitrate reductase of Azotobacter vinelandii. J. Biochem., 48, 50-62 (1960).
3. GUERRERO, M.G., J.M. VEGA, E. LEADBETTER y M. LOSADA. Preparation and characterization of a soluble nitrate reductase from Azotobacter chroococcum. Arch. Mikrobiol., 91, 287-304 (1973).
4. HEWITT, E.J. Physiological and biochemical factors which control the assimilation of inorganic nitrogen supplies by plants, en "Nitrogen nutrition of the plants", editado por E.A. Kirby, University of Leeds, 1970, pág. 78-103.
5. HAGENAN, R.H. y D.P. HUCKLESBY. Nitrate reductase from higher plants, en "Methods in Enzymology", vol. XXIII, editado por A. San Pietro, Academic Press, New York, 1971, pág. 491-503.

6. LOSADA, M. La Fotosíntesis del nitrógeno nítrico. Real Academia de Ciencias, Madrid 1972, pág. 36.
7. SILVER, M.S. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from Hansenula anomala, a nitrate reducing yeast. J. Bacteriol., 73, 241-246 (1957).
8. GARREY, R.H. y A. NASON. Further purification and properties of Neurospora crassa nitrate reductase. J. Biol. Chem., 244, 2870-2882 (1969).
9. DOWNEY, R.J. Characterization of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-nitrate reductase of Aspergillus nidulans. J. Bacteriol., 105, 759-768 (1971).
10. RIVAS, J., M.B. GUERRERO, A. PANEQUE y M. LOSADA. Characterization of the nitrate-reducing system of the yeast Torulopsis nitratophila. Plant Sci. Letters, 1, 105-113 (1973).
11. PANEQUE, A. y M. LOSADA. Comparative reduction of nitrate by spinach nitrate reductase with NADH and NADPH. Biochim. Biophys. Acta, 128, 202-204 (1966).

12. PANEQUE, A., P.J. APARICIO, L. CATALINA y M. LOSADA. Enzymatic reduction of nitrate with flavin nucleotides reduced by a new chloroplast NADH-specific diaphorase. Biochim. Biophys. Acta, 162, 149-151 (1968).
13. LOSADA, M., P.J. APARICIO y A. PANEQUE. Separation of two enzyme activities in the reduction of nitrate with NADH, en Progress in Photosynthesis Research, vol. III, editado por H. Metzner, Institut für Chemische Pflanzenphysiologie, Tübingen, 1969, págs. 1504-1509.
14. EVANS, H.J. y A. NASON. Pyridine nucleotide-nitrate reductase from extracts of higher plants. Plant Physiol., 28, 233-254 (1953).
15. ZUMFT, W.G., A. PANEQUE, P.J. APARICIO y M. LOSADA. Structural and functional role of FAD in the NADH-nitrate reducing system from Chlorella. FEBS Letters, 9, 157-160 (1970).
16. HEWITT, E.J. y D.J.D. NICHOLAS. Enzymes of inorganic nitrogen metabolism, en "Modern Methods of Plant Analysis", vol. 7, editado por H.F. Linsken, B.D. Sanwal y M.V. Tracey. Springer Verlag, Berlin, págs. 67-172 (1964).

17. SCHRADER, L.E., G.L. RITENOUR, G.L. EILRICH y R.H. HAGEMAN. Some characteristics of nitrate reductase from higher plants. Plant physiol., 43, 930-940 (1968).
18. RELINPIO, A.M., P.J. APARICIO, A. PANEQUE y M. LOSADA. Specific protection against inhibitors of the NADH-nitrate reductase complex from spinach. FEBS Letters, 17, 226-230. (1971).
19. RIGANO, C. Quelques observations préliminaires concernant la nitrate-réductase d'Ankistrodemonus braunii. Arch. Mikrobiol., 70, 147-156 (1970).
20. VEGA, J.M., J. HERRERA, A.M. RELINPIO y P.J. APARICIO. NADH-nitrate réductase de Chlorella: Nouvelle contribution à l'étude de ses propriétés. Physiol. Vég., 10, 637-652 (1972).
21. MALDONADO, J.M., J. HERRERA, A. PANEQUE y M. LOSADA. Reversible inactivation by NADH and ADP of Chlorella fusca nitrate reductase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 27-33 (1973).



22. PALACIAN, E., F. De La ROSA, F. CASTILLO y C. GOMEZ-MORENO. Nitrate reductase from Spinach: Reversible inactivation by NAD(P)H and thiols. (en preparación).
23. PANEQUE, A., J. HERRERA, J.M. MALDONADO y M. LOSADA. El complejo NADH-nitrato reductasa de Chlorella y la regulación de sus dos actividades. XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Sevilla 1973. Resúmenes pág. 26.
24. NICHOLAS, D.J.D. y A. NASON. Role of molybdenum as a constituent of nitrate reductase from soybean leaves. Plant Physiol., 30, 135-138 (1955).
25. APARICIO, P.J., J. CARDENAS, W.G. ZUMPT, J.M. VEGA, J. HERRERA, A. PANEQUE y M. LOSADA. Molybdenum and iron as constituents of the enzymes of the nitrate reducing system from Chlorella. Phytochem., 10, 1487-1495 (1971).
26. NOTTON, B.A. y E.J. HEWITT. The role of tungsten in the inhibition of nitrate reductase activity in Spinach (Spinacea oleracea L.) leaves. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 702-710 (1971).

27. VEGA, J.M., J. HERRERA, P.J. APARICIO, A. PANEQUE y M. LOSADA. Role of molybdenum in nitrate reduction by Chlorella. Plant Physiol., 48, 294-299 (1971).
28. MORRIS, I. y P.J. SYRETT. Cyanate inhibition of nitrate reductase. Biochim. Biophys. Acta, 77, 649-650 (1963).
29. VENNESLAND, B y C. JETSCHMANN. The nitrate reductase of Chlorella pyrenoidosa. Biochim. Biophys. Acta, 229, 554-564 (1971).
30. ZUMFT, W.B., A. PANEQUE, P.J. APARICIO y M. LOSADA. Mechanism of nitrate reduction in Chlorella. Biochem. Biophys. Res. Commun., 36, 980-986 (1969).
31. APARICIO, P.J. Mecanismo molecular de la reducción del nitrato a nitrito por la nitrate reductasa de plantas, Anales de la Universidad Hispalense. Serie Ciencias, n.º 13 (1971).
32. NASON, A., A.D. ANTONIE, P.A. KETCHUM, W.A. FRAZIER III y D.K. LEE. Formation of assimilatory nitrate reductase by in vitro inter-cistronic complementation in Neurospora crassa. Proc. Nat. Acad. Sci., (U.S.A.), 65, 137-144 (1970).

33. KETCHUM, P.A., H.Y. CANBIER, W.A. FRAZIER III, C.H. KADANSKY y A. NASON. In vitro assembly of Neurospora assimilatory nitrate reductase from protein subunits of Neurospora mutants and the xanthine oxidizing or aldehyde oxidase systems of higher animals. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 66, 1016-1023 (1970).
34. NASON, A., K.Y. LEE, S.S. PAN, P.A. KETCHUM, A. LAMBERTI y J. DeVRIES. In vitro formation of assimilatory reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: nitrate reductase from a Neurospora mutant and a component of molybdenum-enzymes. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 68, 3242-3246 (1971).
35. BEEVERS, L. y R.H. HASEMAN. Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 495-522 (1969).
36. LOSADA, M., A. PANEQUE, P.J. APARICIO, J.M. VEGA, J. CARDENAS y J. HERRERA. Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in Chlorella. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 1009-1015 (1970).
37. HERRERA, J., A. PANEQUE, J.M. MALDONADO, J.L. BAREA y M. LOSADA. Regulation by ammonia of nitrate reductase

- synthesis and activity in Chlamydomonas reinhardtii. Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 996-1003 (1972).
38. RIGANO, C., Studies on nitrate reductase from Cyanidium caldarium. Arch. Mikrobiol., 76, 265-276 (1971).
39. MORENO, C.G., P.J. APARICIO, E. PALACIAN y M. LOSADA. Interconversion of the active and inactive forms of Chlorella nitrate reductase, FEBS Letters, 26, 11-14 (1972).
40. JETSCHMANN, C., L.P. SOLOMONSON y B. VENNESLAND. Activation of nitrate reductase by oxidation. Biochim. Biophys. Acta, 275, 276-278 (1972).
41. LOSADA, M. y D.I. ARNON. Selective inhibitors of photosynthesis, en Metabolic Inhibitors, vol. II, editado por R.M. Hochster y J.H. Quastel. Academic Press, New York, (1963), pág. 559-593.
42. LOSADA, M., J. HERRERA, J.M. MALDONADO y A. PANEQUE. Mechanism of nitrate reductase reversible inactivation by ammonia in Chlamydomonas. Plant Sci. Letters, 1, 31-37 (1973).

43. FISCHER, E.H. y E.G. KREBS. Conversion of phosphorilase b to phosphorilase a in muscle extract. J. Biol. Chem., 216, 121-132 (1955).
44. SEVILLA, C.L. y E.H. FISHER. The purification and properties of rat muscle glycogen phosphorylase. Biochemistry, 8, 2161-2171 (1969).
45. RYLEY, W.D., R.J. DeLANGE, G.E. BRATVOLD y E.G. KREBS. Reversal of phosphorylase kinase activation. J. Biol. Chem., 243, 2209-2215 (1968).
46. DeLANGE, R.J., R.G. KEMP, R.D. RILEY, R.A. COOPER y E.G. KREBS. Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by adenosine triphosphate and adenosine 3'-5'-monophosphate. J. Biol. Chem., 243, 2200-2208 (1968).
47. SODERLING, J.R., J.P. HICKENBOTTON, E.M. REIMANN, F.L. HUNKELER, D.A. WALLASH y E.G. KREBS. Inactivation of glycogen synthetase and activation of phosphorylase kinase by skeletal muscle adenosine 3'-5'-monophosphate-dependent protein kinases. J. Biol. Chem., 245, 6317-6328 (1970).

48. VILLAR PALASI, C. y U.P. LARNER. Glycogen metabolism and glucolytic enzymes. Ann. Rev. Biochem., 39, 639-672 (1970).

49. CORBIN, J.D., E.M. REIMAN, D.A. WALSH y E.C. KREBS. Activation of adipose tissue lipase by skeletal muscle cyclic adenosine 3'-5' monophosphate-stimulated protein kinase. J. Biol. Chem., 245, 4849-4851 (1970).

50. MARTELLO, O.J., S.L. WOO, E.M. REIMANN, y E.W. DAVIE. Effect of protein kinase on ribonucleic acid polymerase. Biochemistry, 9, 4807-4813 (1970).

51. ANDERSON, W.B. y E.R. STADMANT. Glutamine synthetase deadenylation: a phosphorolytic reaction yielding ADP as nucleotide product. Biochem. Biophys. Res. Commun., 41, 704-709 (1970).

52. CHELALA, C.A., L. HIRSCHBEIN y H.N. TORRES. Interconvertible forms of Escherichia coli RNA polymerase. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 68, 152-154 (1971).

53. HONJO, T., Y. NISHIZUKA y O. HAYAHISHI. Cold Spring Harbour Simp. Quant. Biol., 34, 603 (1969).

54. HOLZER, H. y W. DUNTZE. Metabolic regulation by chemical modification of enzymes. Ann. Rev. Biochem., 40, 345-374 (1971).
55. MERLEVEDE, N. y G.A. RILEY. The activation and inactivation of phosphorilase phosphatase from bovine adrenal cortex. J. Biol. Chem., 241, 3517-3524 (1966).
56. HASCHE, R.H., L. HEILMEYER y E. HELMREICH. Why are enzymes interconvertibles? en Metabolic Interconversion of Enzymes, editado por O. Wieland, E. Helmreich y H. Holzer, Springer Verlag, Berlin, pág. 405-415 (1972).
57. PREISS, J. y T. KOSUGE. Regulation of enzyme activity in photosynthetic systems. Ann. Rev. Plant Physiol., 21, 433-466 (1970).
58. JENSEN, R.G. y J.A. BASSHAM. Photosynthesis by isolated chloroplasts. III Light activation of the carboxylation reaction. Biochim. Biophys. Acta, 153, 227-234 (1968).
59. WILDNER, G.L. y R.S. CRIDDLE. Ribulose diphosphate carboxylase. I A factor involved in light activation of the enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 952-960 (1969).

60. RUTNER, A.C. y N.D. LANE. Nonidentical subunits of ribulose diphosphate carboxylase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 28, 531-537 (1967).
61. HAGEMAN, R.H. y D.I. ARNON. Changes in glyceraldehyde phosphate dehydrogenase during the life cycle of a green plant. Arch. Biochem. Biophys., 57, 421-436 (1955).
62. BRAVERMAN, G y N. KOBIESBERG. On the formation of the TPN-requiring glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase during the production of chloroplasts in Euglena gracilis. Biochim. Biophys. Acta, 43, 374-381 (1960).
63. FULLER, R.C. y G.A. HUDOCK. Triose phosphate dehydrogenase in plant and microbial photosynthesis, en Biochemistry of chloroplasts, editado por T.W. Goodwin, vol. II, Academic Press, New York, pág. 181-190 (1967).
64. MULLER, B., I. ZIEGLER y H. ZIEGLER. Lichtinduzierte, reversible aktivitätssteigerung der NADP-abhängigen glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase in chloroplasten. Zum mechanism der reaction. Eur. J. Biochem., 9, 101-106 (1969).



65. ANDERSON, L.E. y T. LIM. Chloroplast glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: light-dependent change in the enzyme. FEBS Letters, 27, 189-191 (1972).
66. SMILLIE, R.M. Can. J. Bot., 41, 123-134 (1964). Citado por Preiss, J. y T. Koehn (ref 57).
67. BUCHANAN, B.B., P.P. KALBERER y D.I. ARNON. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of isolated chloroplasts. Fed. Proc., 27, 244 (1968).
68. BUCHANAN, B.B., P. SCHURMANN y P.P. KALBERER. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. J. Biol. Chem., 246, 5952-5959 (1971).
69. LATZKO, E., R. GARNIER y M. GIBBS. Effects of photosynthesis, photosynthetic inhibitors and oxygen on the activity of ribulose 5-phosphate kinase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 1140-1144 (1970).
70. HATCH, M.D. y J.F. TURNER. A protein disulfide reductase from pea seeds. Biochem. J., 76, 556-562 (1960).

71. MEANS, G.E. y R.E. FEENEY. Chemical modification of proteins, Holden-Day, San Francisco (1971)
72. ELDJARN, L. y A. PIHL. J. Biol. Chem., 225, 449 (1957)
73. CLELAND, W.W. Dithiothreitol, a new protective reagent for -SH groups. Biochemistry, 3, 480-482 (1964).
74. CECIL, R. Intramolecular bonds in proteins. I The role of sulfur in proteins, en The Proteins, vol. 1, 2<sup>a</sup> edición, editado por H. Neurath, Academic Press, New York (1963) pág. 380-466.
75. PARKER, D.J. y W.S. ALLISON. The mechanism of inactivation of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase by tetrathionate, o-iodosobenzoate and iodine monochloride. J. Biol. Chem., 244, 180-189 (1969).
76. BABALOLA, O., R. CANGEDDA y L. LUZZATTO. Genetic variants of glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes: unique properties of the A-variant isolated. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 69, 946-950 (1972)

77. KIDBY, D.K. Anal Biochem., 28, 230 (1969). Citado por Jocelyn, P. C., en Biochemistry of -SH group. Academic Press, London (1972), pag. 141.
78. KATYAL, J.H., J. LESLIE, H.F. BUTLER y G. GORIN. The denaturation of ovalbumin and its reaction - with ferricyanide. Arch. Biochem. Biophys., 94, 54-58 (1961).
79. JOCELYN, P.C. Biochemistry of -SH group. Academic Press, London (1972).
80. GOMEZ-MORENO, C. y E. PALACIAN. Nitrate reductase from Chlorella, reversible inactivation by thiols and sulfite, Arch. Biochem. Biophys. (en prensa).
81. MORENO, C.G., P.J. APARICIO, E. PALACIAN y M. LOSADA. Inactivación, protección y reactivación de las dos actividades del complejo nitrato reductasa de Chlorella. XII Reunión de la Sociedad Española de Bioquímica, Madrid (1972), Resúmenes pag. 116.
82. GOMEZ-MORENO, C. y E. PALACIAN. Protección con -NADP<sup>+</sup> de la inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella fusca. XIV Reunión de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas, Sevilla (1973), Resúmenes 3.6.

83. GOMEZ-MORENO, C., F. CASTILLO, F.F. de la ROSA y E. PALACIAN. Reversible inactivation of the nitrate reductase from Chlorella fusca and spinach. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca (1973), Resúmenes d. 98.
84. KESSLER, E. y F.C. CZYGAN. Physiologische und biochemische beitrage zur taxonomie der gattung Chlorella. Arch. Mikrobiol., 70, 211-216 (1970).
85. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
86. APARICIO, P.J., A. PANEQUE, N. RODRIGUEZ-LOPEZ y M. LOSADA. Estudio de la nitrate reductasa del alga Chlorella. Anal. Aula Dei, 10, 744-753 (1969).
87. PANEQUE, A., F.F. DEL CAMPO, J.M. RAMIREZ y M. LOSADA. Flavin nucleotide nitrate reductase from spinach. Biochim. Biophys. Acta., 109, 79-85 (1965).
88. SNELL, E.D. y C.T. SNELL. Colorimetric methods of analysis. D. Van Nostrand Company, Academic Press, New York, (1949) pág. 804.

89. ZHALER, W.L. y W.W. CLELAND. A specific and sensitive assay for disulfides. J. Biol. Chem., 243, 716-719 (1963).
90. WOOD, W.A. Aminoacid racemases, en Methods in Enzymology, vol. 11, editado por S.P. Colowick y N.O. Kaplan. Academic Press, New York (1955) pág. 214.
91. KOLTHOFF, J.M. y B.R. VILFORD. The interaction of copper (II) with bovine serum albumin. J. Am. Chem. Soc., 80, 5673-5678 (1958).
92. EISELE, B. y K. VALLENFELS. The stereoselective inhibition of functional -SH groups of dehydrogenases. Pyridine nucleotide-dependent dehydrogenases. Editado por H. Sund. Springer Verlag, Berlin (1969) pág. 91-101.
93. OLSON, E.J. y J.H. PARCK. Studies on the mechanism and active site for the stereolytic activity of 3-phosphoglyceraldehyde dehydrogenase. J. Biol. Chem., 239, 2316 (1964).
94. COLOWICK, S.B., J. van EYS y J.H. PARK. Dehydrogenation en Comprehensive Biochemistry, vol. 14, editado por H. Florkin y B.H. Stotz, Elsevier, Amsterdam, (1966) p.1-88

95. SABATO, G.D. y H.O. KAPLAN. The role of sulfhydryl groups of lactic dehydrogenases. Biochemistry, 2, 776-781 (1963)
96. SALOMONSON, L.P., K. JETSCHMANN y B. VENNESLAND. Reversible inactivation of the nitrate reductase of Chlorella vulgaris Beijerinck. Biochim. Biophys. Acta, 309, 32-43 (1973)
97. SALOMONSON, L.P. y B. VENNESLAND. Properties of a nitrate reductase of Chlorella. Biochim. Biophys. Acta, 267, 544-557 (1972)
98. BLACK, S. The biochemistry of sulfur-containing compounds Ann. Rev. Biochem., 32, 399-418 (1963)
99. ONDARZA, R.H. y R. ABNEY. On the active site of the NADPH-dependent CoA-S-S-glutathione reductase from yeast and rat liver. FEBS Letters, 7, 227-230 (1970)
100. TIETZE, F. Disulfide reduction in rat liver. I Evidence for the presence of non specific nucleotide-dependent disulfide reductase and GSH-disulfide transhydrogenase activities in the high-speed supernatant fraction. Arch. Biochem. Biophys., 138, 177-188 (1970)

101. LOSADA, H. Interconversion of nitrate and nitrite reductase of the assimilatory type. 3rd International Symposium on the Metabolic Interconversion of Enzymes, Seattle, Washington (1973). Resúmenes pag. 38-39.
102. BASSHAM, J.A. Photosynthetic carbon metabolism. Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.), 68, 2877-2882 (1971)

FACULTAD DE CIENCIAS

En el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. CARLOS GOMEZ-MORENO CALERA

titulada "Interconversión entre una forma oxidada y activa de la nitrito reductasa y otra reducida e inactiva".

acordó otorgarle la calificación de SOBRESALIENTE

cum laude.

Sevilla, 29 de noviembre 1973

El Vocal,

*[Signature]*

El Vocal,

*[Signature]*

El Vocal,

*[Signature]*

El Presidente,

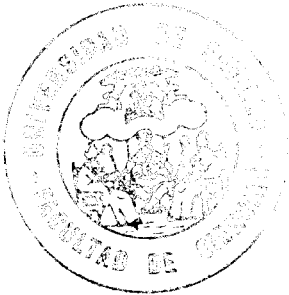
*[Signature]*

El Secretario,

*[Signature]*

El Doctorado,

*[Signature]*



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672253