



R.4637

TD TD  
682 682

NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA. EFECTO DE DIVERSOS TRATAMIENTOS FISICOS Y QUIMICOS SOBRE LAS ACTIVIDADES CATALITICAS Y LA INACTIVACION POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS.

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias por el Licenciado D. Francisco Castillo Rodríguez.

Sevilla, Noviembre, 1975

Director

Dr. Enrique Palacián Gil  
Investigador del CSIC

Ponente

Prof. Manuel Losada Villasante  
Catedrático de Bioquímica



8-11-75  
656

A mis padres

A la familia Ferrer

A Carmen

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias y CSIC de la Universidad de Sevilla bajo la dirección del Dr. Enrique Palacián Gil.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Profesor D. Manuel Losada Villasante y al Dr. D. Enrique Palacián Gil, quienes con una dedicación constante me han iniciado en la investigación científica y han hecho posible la realización de esta tesis.

Al Dr. D. Antonio Paneque Guerrero le agradezco su colaboración y valiosa labor crítica.

Al Dr. D. Jacobo Cárdenas Torres, que me ayudó especialmente en mis primeros trabajos en el laboratorio.

A los doctores J.M. Vega Piqueres, M.G. Guerrero, J. L. Barea, J.M. Maldonado, J. Rivas y especialmente, al Dr. C. Gómez-Moreno y a mis compañeros F.F. de la Rosa, M<sup>a</sup> Angeles Novales, F. Calero y J.M. Roldán por su eficaz ayuda.

Mi sincero agradecimiento a las Sras. Dñas. M<sup>a</sup> J. Pérez de León y M<sup>a</sup> Isabel Carretero, así como a D. José Moreno por su ayuda en la realización de esta tesis.

A mis compañeros F. Sosa, M<sup>a</sup> Tortolero, C. Manzano, A. Chaparro, T. Ortega y A. Villalobo.

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

## INDICE

Abreviaturas .....	7
I. INTRODUCCION .....	8
II. MATERIALES Y METODOS .....	29
1. Material biológico .....	30
2. Purificación de la nitrato reductasa .....	30
3. Preparación de la nitrato reductasa calentada ....	33
4. Tratamiento con reactivos del grupo sulfhidrilo ..	34
5. Ensayos enzimáticos .....	34
6. Métodos analíticos .....	36
7. Reactivos .....	36
8. Aparatos .....	37
III. RESULTADOS .....	39
1. INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS .....	40
1.1. Inactivación reversible por NAD(P)H .....	40
1.2. Inactivación por NAD(P)H de preparaciones ca- lentadas de nitrato reductasa .....	40
1.3. Efecto del nitrato sobre la inactivación de la nitrato reductasa por NAD(P)H .....	46
2. INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILLO .....	46
2.1. Efecto de los reactivos del grupo sulfhidrilo sobre las tres actividades del complejo .....	46
2.2. Reactivación por DTE de la nitrato reductasa tratada con mercuriales .....	48
2.3. Protección por algunos compuestos de la inac- tivación de la diaforasa por reactivos del grupo sulfhidrilo .....	52

3.	INACTIVACION POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS DE LA NITRATO REDUCTASA MODIFICADA POR REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILLO .....	59
3.1.	Inactivación por NADH de la nitrato reductasa modificada .....	59
3.2.	Inactivación por NADPH de la nitrato reductasa modificada .....	69
4.	REACTIVACION POR FERRICIANURO DE DISTINTAS PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA INACTIVADAS POR NADH .....	73
5.	EFEECTO DEL FAD SOBRE LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS ..	76
5.1.	Inactivación por NAD(P)H y FAD .....	76
5.2.	Inactivación por NAD(P)H, CNK y FAD .....	79
5.3.	Inactivación por NAD(P)H y FAD de una preparación tratada con p-HMB y sustratos protectores .....	79
5.4.	Efecto del FAD sobre la inactivación por NADH de una preparación tratada con p-HMB y DTE .....	83
6.	INACTIVACION POR NAD(P)H y FAD DE PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA TRATADAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE p-HMB .....	83
6.1.	Efecto de la concentración de p-HMB sobre la capacidad de inactivación por NADH .....	83
6.2.	Efecto de la concentración de p-HMB sobre la capacidad de inactivación por NADPH .....	86
7.	INACTIVACION POR NAD(P)H Y FMN .....	86
IV.	DISCUSION .....	92
V.	CONCLUSIONES .....	107
VI.	BIBLIOGRAFIA .....	112

ABREVIATURAS.

ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
DCMU	3-(3',4'-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DTE	2,3 -dihidroxi-1,4-ditioi butano (ditioeritritol)
DTNB	Acido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín <del>adenín</del> mononucleótido
FNH <sub>2</sub>	FAD o FMN reducidos
NEM	N-etil-maleimida
p-HMB	p-hidroximercuribenzoato
p-HMBS	p-hidroximercurifenilsulfonato
g	Aceleración de la gravedad
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H	NADH o NADPH indistintamente
NO <sub>3</sub> Rasa	Nitrato reductasa
Tris	Tri-(hidroximetil)-aminometano
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético (sal sódica)



## INTRODUCCION

Uno de los elementos biogénicos más importantes es el nitrógeno, que constituye aproximadamente un 2% del peso seco de las plantas, y que es incorporado por éstas en cantidades no inferiores a los diez mil millones de toneladas anuales. Exceptuando las especies que tienen asociaciones simbióticas con las bacterias fijadoras del nitrógeno atmosférico, la incorporación del nitrógeno a las plantas se realiza a expensas del nitrato disuelto en el agua del suelo o en las masas de agua oceánicas y fluviales.

El componente nitrogenado metabólicamente utilizable por las plantas es el amonio; por tanto, la reducción del nitrato a amonio es necesaria para que las plantas puedan incorporar el nitrógeno a su metabolismo. El proceso de reducción del nitrato a amonio requiere la transferencia de ocho electrones y la intervención de dos enzimas distintos (1).

La conversión enzimática del nitrato en amonio tiene lugar en dos etapas sucesivas (2,3,4). La primera etapa es una reacción catalizada por la nitrato reductasa y consiste en la transferencia de dos electrones al nitrato, que se reduce a nitrito. La segunda etapa es una reacción catalizada por la nitrito reductasa, que transfiere seis electrones al nitrito y lo reduce a amonio. En ninguna de las dos etapas se

han detectado compuestos intermediarios ricos en energía o se requiere ATP.

La nitrato reductasa de plantas superiores ha sido purificada parcialmente a partir de hojas de espinaca (5,6) y al parecer es una molibdoflavoproteína (7,8) cuyo peso molecular es aproximadamente 500.000 (5,7).

El enzima fue estudiado por primera vez por Nason y Evans (8). Posteriormente, Losada y colaboradores encontraron que los flavín nucleótidos reducidos por cloroplastos iluminados actuaban como donadores de electrones en la reducción enzimática del nitrato (9). En la oscuridad, los flavín nucleótidos reducidos por ditionito o por el sistema NADP-reductasa podían actuar como donadores de electrones de la nitrato reductasa (10,11,12,13).

Las nitrato reductasas de plantas superiores y algas verdes pueden también utilizar NADH como donador de electrones (1,2,5,14,15). Dado que la concentración de flavín nucleótidos reducidos necesaria para conseguir "in vitro" una actividad enzimática óptima era muy alta (40-100 veces más alta que si se utilizaba NADH como donador de electrones), se ha sugerido que el NADH puede ser el donador fisiológico de

electrones de la nitrato reductasa de plantas superiores (13).

En la transferencia de electrones desde el NADH al nitrato participan secuencialmente dos porciones enzimáticas cuyas actividades pueden ensayarse independientemente (5,16 17).

La primera porción del complejo es una diaforasa que utiliza NADH como donador de electrones y que puede reducir "in vitro" al citocromo c y a otros aceptores como el ferricianuro y el 2,6-diclorofenol indofenol (16,17).

La segunda porción del complejo, FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa, parece ser una molibdo-proteína (7) y puede utilizar "in vitro" FMN, FAD o viológenos reducidos como donadores de electrones (5). Asimismo, la FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa puede recibir los electrones del NADH a través de la porción diaforásica, y el sistema funcionaría entonces como una NADH-nitrato reductasa (18).

Existían ciertos indicios que sugerían que la nitrato reductasa de Chlorella era una flavoproteína y que el FAD era necesario para la actividad NADH-nitrato reductasa (19). Posteriormente esta suposición se ha confirmado plenamente, así como que el enzima posee al menos dos grupos hemo del tipo b (Solomonson et al, en prensa). Por otra parte, la ni-

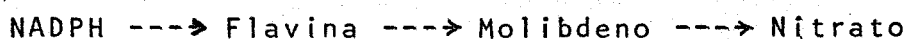
trato reductasa de Neurospora posee un grupo prostético de flavina que interviene como transportador de electrones en la reducción enzimática del nitrato a nitrito (20). También la nitrato reductasa de soja presenta ciertos requerimientos de FAD (8) y tanto el enzima de espinaca como el de Chlorella y Chlamydomonas se protegen por FAD de la desnaturación térmica (5, 21). Solamente se poseen pruebas indirectas (5), pero puede deducirse de ellas que la nitrato reductasa de espinaca parece ser también una flavoproteína como las nitrato reductasas de otras plantas superiores (7).

La nitrato reductasa de plantas superiores se inactiva por reactivos del grupo sulfhidrilo (13, 23), siendo la actividad NADH-diaforasa particularmente sensible al p-HMB (13). La  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa no es tan sensible a dichos reactivos y sólo se inactiva en presencia de altas concentraciones de los mismos.

El tratamiento térmico que destruye la actividad diaforasa (calentamiento a  $45^\circ\text{C}$  durante 5 minutos en ausencia de FAD) no afecta a la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. Otra característica de esta segunda actividad es que se inhibe por el cianuro, la azida y el carbamil fosfato (23), siendo estas inhibiciones de carácter competitivo frente al nitrato. La inac-

tivación por cianuro de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa es reversible, ya que la actividad puede recuperarse eliminando el cianuro mediante diálisis.

El molibdeno es un elemento esencial en el proceso de asimilación del nitrato en plantas superiores (25,26,27) y ha sido identificado como componente del grupo prostético de la nitrato reductasa (1,28,29). Nicholas y Nason han estudiado el efecto de la deficiencia de molibdeno en el enzima de *Neurospora*, así como su papel como grupo prostético de la nitrato reductasa de dicho organismo (20,30,31,32). Ambos autores han propuesto el siguiente esquema del proceso de reducción del nitrato a nitrito en *Neurospora*:



También se ha demostrado que el molibdeno es un componente esencial de la nitrato reductasa de bacterias (33) y algas verdes (34). Recientemente, Solomonson ha identificado al molibdeno como componente del grupo prostético de la nitrato reductasa de *Chlorella* (Solomonson et al, en prensa).

Notton y Hewitt han proporcionado pruebas indirectas de que la nitrato reductasa de espinaca contiene molibdeno como grupo prostético (35,36) y han demostrado el papel del

wolframio en la aparición de un complejo enzimático que carece de la actividad  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa (37,38,39), así como la inducción por molibdeno del complejo enzimático activo (39,40).

Se puede concluir pues, que el molibdeno forma parte del grupo prostético de la nitrato reductasa de algas verdes como Chlorella y que es probable que la nitrato reductasa de plantas superiores sea también una molibdoproteína.

El tema de la inducción de la nitrato reductasa en plantas superiores ha sido muy debatido, aunque actualmente parece probable que la nitrato reductasa sea inducible por nitrato (1) y molibdeno (41,42,43).

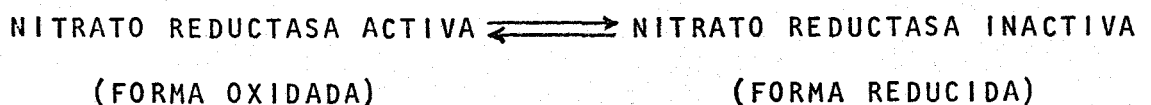
Las nitrato reductasas de Chlorella y Chlamydomonas están sometidas a represión nutricional por amonio (44,45). Esta represión afecta tanto a la actividad diaforasa como a la actividad nitrato reductasa, ya que las células que crecen en amonio como fuente de nitrógeno carecen del sistema enzimático completo.

Por otra parte, la adición de amonio a un cultivo de células de Chlorella que crecen en nitrato provoca la desaparición inmediata de la actividad nitrato reductasa pero no de la NADH-diaforasa (44). La actividad nitrato reductasa puede recupe -

rarse "in vivo" eliminando el amonio del medio de cultivo e "in vitro", incubando el enzima inactivo con ferricianuro (46) u otros oxidantes (47). Ya que el enzima inactivo puede reactivarse "in vitro" en presencia de oxidantes, parece razonable deducir que el enzima inactivo se encuentra en estado reducido.

Losada y Arnon demostraron que el amonio es un desacomplante de la fotofosforilación (48), así que la presencia de amonio produce un acúmulo de poder reductor en el organismo fotosintético. Este acúmulo de poder reductor podría ocasionar la reducción, y consiguiente inactivación, de la nitrato reductasa (49). Esta suposición se apoya en el hecho de que el DCMU o la menadiona, que impiden el acúmulo de poder reductor, impiden también la inactivación "in vivo" de la nitrato reductasa por amonio. Además, la nitrato reductasa de algas verdes puede ser inactivada "in vitro" por NADH (45) y se reactiva mediante incubación con ferricianuro.

Basándose en los resultados citados, se ha elaborado una teoría según la cual la nitrato reductasa de algas verdes está regulada por un mecanismo de interconversión:





Aunque existen bases suficientes para admitir que los piridín nucleótidos reducidos son los causantes de la inactivación "in vivo" del enzima, en la actualidad se desconoce el tipo de mecanismo que causa la oxidación, y por tanto la reactivación, de la nitrato reductasa.

Vega et al. (52) encontraron que la inactivación de la nitrato reductasa de Chlorella por cianuro se potenciaba enormemente si el enzima se preincubaba con NADH. Esta inactivación no se eliminaba por diálisis, al contrario de lo que ocurría con la inhibición por cianuro del enzima oxidado. Igual ocurre con la nitrato reductasa de Neurospora crassa (53) y con la de espinaca, que se inactivan rápidamente si se incuban con NADH y cianuro a muy bajas concentraciones.

Las semejanzas de índole estructural y funcional entre las nitrato reductasas de algas verdes y plantas superiores, así como el paralelismo que existe entre los procesos de inactivación "in vitro" del enzima en ambos tipos de organismos, sugieren la posibilidad de que la reducción del nitrato en plantas superiores esté sometida a un proceso de

regulación por interconversión de la nitrato reductasa. Sin embargo, no existen evidencias directas que apoyen esta hipótesis y es de desear que en los próximos años el avance en el conocimiento de la asimilación enzimática del nitrato permita establecer definitivamente el mecanismo regulador de un proceso metabólico tan importante para los organismos asimiladores de nitrato, y por tanto, para los organismos vivos en general.

Para contribuir al conocimiento del proceso de inactivación de la nitrato reductasa, en el presente trabajo se ha estudiado la inactivación "in vitro" del enzima por los piridín nucleótidos reducidos y se han utilizado una serie de reactivos del grupo sulfhidrilo que, al producir modificaciones químicas en el enzima, nos han permitido estudiar la inactivación por piridín nucleótidos reducidos del enzima modificado.

Vamos a hacer a continuación una breve revisión sobre la modificación química de las proteínas y sus repercusiones sobre la estructura y función de las mismas.

Los métodos químicos para el estudio de las proteínas se han desarrollado enormemente, sobre todo a partir del año 1945.

En el progreso de los métodos químicos para el estudio de las proteínas han sido decisivos una serie de reactivos que las modifican de un modo específico. Dichos reactivos pueden ser específicos para un determinado grupo, cuya modificación provoca un cambio en la proteína que puede traducirse en la alteración de las propiedades catalíticas o estructurales del enzima.

La capacidad de reacción de los distintos grupos depende del lugar en que estén situados dentro de la proteína. Así, un grupo puede tener una gran afinidad por un determinado reactivo y no reaccionar con el mismo al encontrarse en un lugar inaccesible a dicho reactivo. Con frecuencia, se utilizan agentes desnaturalizantes (urea, clorhidrato de guanidina) para incrementar la accesibilidad de los grupos a los distintos reactivos.

La modificación diferencial de los aminoácidos de una proteína con un determinado reactivo está basada en las distintas propiedades químicas de los sitios en que están situados los aminoácidos en la cadena polipeptídica plegada en el espacio. La capacidad de reacción de la mayoría de los gru -

pos depende de su estado iónico, por lo que el pH del medio ambiente de cada grupo es uno de los factores determinantes de dicha capacidad de reacción. El grupo sulfhidrilo es más reactivo en su forma ionizada ( $-S^-$ ) y la ionización tiene lugar en un intervalo de pH comprendido entre 8 y 9 aproximadamente, así que la reacción de un grupo sulfhidrilo con reactivos cargados del tipo de los mercuriales, tendrá lugar a un pH neutro o más bien alcalino. La protonación de los grupos amino e imidazol trae como consecuencia la incapacidad de estos grupos de reaccionar con la mayor parte de los reactivos.

La capacidad de reacción de un grupo puede estar influida positiva o negativamente por los grupos vecinos. El grupo amino de la lisina nº 41 de la ribonucleasa pancreática no reacciona con reactivos cargados positivamente, como la o-metil-isourea, dada su proximidad al centro activo, que está cargado positivamente (54).

También influye la polaridad del medio en que se encuentre el grupo en cuestión. Los grupos hidrófobos interiores (leucina, isoleucina) normalmente son inaccesibles al disolvente y, por tanto, a los reactivos polares. Las propiedades químicas del reactivo influyen en la capacidad de

reacción de un grupo no accesible al disolvente. Los grupos sulfhidrilo de la ovoalbúmina nativa no reaccionan con reactivos polares como el DTNB y la N-etil-maleimida y reaccionan perfectamente con reactivos de naturaleza más hidrofóbica como el p-HMB. Sin embargo, dichos grupos -SH reaccionan con el DTNB y la N-etil-maleimida si se somete la ovoalbúmina a un tratamiento desnaturizador (54). Las diferencias en cuanto a la capacidad de reacción de los reactivos del grupo sulfhidrilo se deben al carácter hidrofóbico de dichos grupos y a su presencia en medios hidrofóbicos dentro de la proteína (55), junto con la capacidad del reactivo de penetrar en dichas regiones. La reacción entre los grupos sulfhidrilo de la alcohol deshidrogenasa de levaduras es menos rápida y completa con la N-etil-maleimida que con un reactivo homólogo menos polar como la N-butil-maleimida (56). Se obtuvieron resultados similares con la fumarasa de cerdo y reactivos de distinta polaridad (57).

También puede influir el tamaño molecular del reactivo. Los mercuriales orgánicos, de tamaño más grande que el ión mercurico tienen a veces una capacidad de reacción menor debido a los efectos estéricos que limitan su aproximación a muchos grupos de la proteína.

La carga del producto formado como consecuencia de la reacción de un grupo con un determinado reactivo puede influir en la modificación de las propiedades de la proteína. Así, las haloacetamidas y los haloacetatos suelen producir cambios distintos en una misma proteína, debido quizá al diferente carácter iónico de los productos de la reacción (54).

La acción de un determinado reactivo sobre el centro activo de una proteína puede traducirse en una pérdida de la actividad catalítica. La modificación de los grupos sulfhidrilo situados en los centros activos de muchas enzimas trae como consecuencia la inactivación de los mismos (58,59). La reacción del yodoacetato con los centros activos cargados positivamente de la ribonucleasa pancreática A (60) y de la ribonucleasa T1 de *A. orizae* (61) dá lugar a la inactivación de ambas enzimas.

A veces, los sustratos ejercen efectos protectores contra este tipo de inactivaciones. La alcohol deshidrogenasa de hígado de caballo se protege por NADH de la inactivación por yodoacetato (62).

Las modificaciones químicas producidas por algunos reactivos pueden ser reversibles. Por ejemplo, las modificaciones producidas por el DTNB y el p-HMB se eliminan me-

dianete un tratamiento con exceso de tiol.

Los reactivos del grupo sulfhidrilo pueden inactivar a los enzimas sin modificar directamente los sitios activos, al afectar la estructura tridimensional. La glucógeno fosforilasa b (dímero), mediante un tratamiento con DTNB se inactiva y pasa a glucógeno fosforilasa b (monómero) (63). Otros reactivos del grupo sulfhidrilo actúan sobre el enzima de la misma forma que el DTNB (64,65).

El tratamiento con mercuriales origina la disociación de la aspartato transcarbamilasa en dos clases de subunidades que se pueden purificar independientemente (66,67). Este tratamiento incrementa la actividad catalítica máxima y hace desaparecer las interacciones alostéricas entre las subunidades (68). También se ha descrito que el octámero de la hemeritrina se disocia en monómeros mediante un tratamiento con N-etil-maleimida (69).

Los reactivos del grupo sulfhidrilo pueden usarse para el estudio de la intervención de dichos grupos en la actividad catalítica. Así, la fructosa 1,6-difosfatasa de hígado de conejo se activa por los cinco primeros equivalentes de p-HMB ligados por mol de enzima. A partir de este punto,

la actividad decrece rápidamente y llega a ser nula cuando se han fijado 20 equivalentes de p-HMB por mol de enzima (70). La NADP-isocitrato deshidrogenasa de corazón de cerdo se inactiva después de la reacción de cinco grupos sulfhidrilo con el DTNB (71) y se reactiva parcialmente tratando el enzima con mercaptoetanol. La gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa se inactiva después de que cuatro grupos sulfhidrilo reaccionan con el DTNB (54).

La especificidad de reacción de muchos reactivos del grupo sulfhidrilo puede aprovecharse para determinaciones cuantitativas, como la determinación del contenido en grupos sulfhidrilos de una proteína. Con este fin pueden utilizarse la N-etil-maleimida, el DTNB y el p-HMB (72,73).

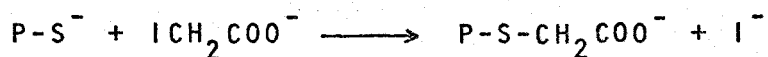
Vamos a citar a continuación los reactivos del grupo sulfhidrilo que se han empleado en el presente trabajo, así como sus propiedades y reacciones características.

### HALOACETATOS

En general, los haloacetatos son agentes alquilantes (74) y su reacción con un grupo específico de la proteína



depende del pH. La reacción preferencial de los haloacetatos es con los grupos sulfhidrilo y la velocidad de la reacción es mayor a pH neutro o alcalino, ya que la forma disociada del grupo -SH es la más reactiva. La reacción es la siguiente:



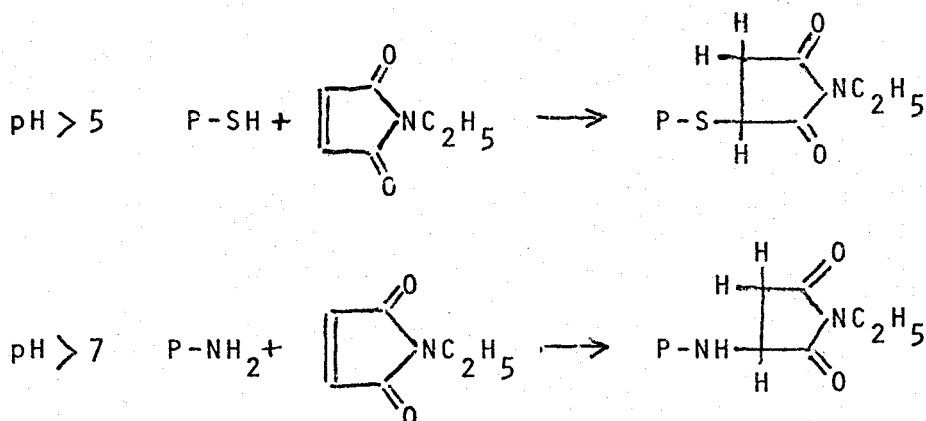
Los haloacetatos pueden reaccionar también con los grupos imidazol, tioeter y amino, dependiendo del pH (54).

Para producir modificaciones químicas en las proteínas se utilizan el yodoacetato, el bromoacetato y el cloroacetato, siendo el yodoacetato el que tiene mayor capacidad de reacción.

#### MALEIMIDAS.

La reacción de las maleimidias con los grupos de las proteínas depende del pH. La N-etil-maleimida (NEM) reacciona con los grupos amino a pH neutro o alcalino y con los gru-

pos sulfhidrilo, a pH ácido o neutro.

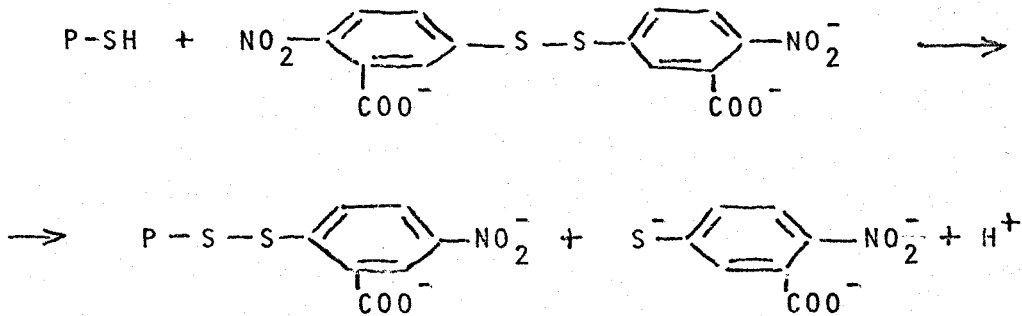


Los productos de estas reacciones han sido aislados e identificados (75,76).

La NEM es una sustancia que absorbe a 300 nm, con un coeficiente de extinción de  $620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y reacciona muy específicamente con los grupos sulfhidrilo. Se utiliza para determinaciones cuantitativas de dichos grupos, ya que el producto de la reacción no absorbe a esa longitud de onda. Puede usarse también como agente específico modificador de grupos amino, pero en proteínas que no contengan grupos sulfhidrilo.

#### ACIDO 5,5'-DITIOBIS-(2-NITROBENZOICO).

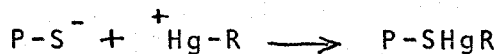
A pH neutro, el DTNB reacciona específicamente con los grupos sulfhidrilo de las proteínas:



Por cada grupo sulfhidrilo que reaccione con el DTNB se libera un anión tionitrobenzoato, que tiene una banda de absorción a 412 nm, con un coeficiente de extinción de  $1,36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

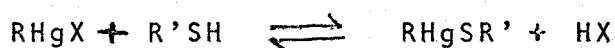
#### MERCURIALES.

Reaccionan rápida y específicamente con los grupos sulfhidrilo de las proteínas (77). Normalmente, no afectan a otros grupos.



La velocidad óptima de reacción de los mercuriales con las proteínas es a un pH de 5,5. A un pH más alto, aumenta la forma disociada del grupo SH, que es más reactiva, pero los grupos  $\text{OH}^-$  pueden competir por el mercurial y la reacción con la proteína va más lenta.

Los mercuriales se combinan fuertemente con los grupos sulfhidrilo, según la ecuación:



La constante de disociación tiol-mercurial, en las condiciones que son usuales en la técnica de modificación de proteínas es del orden de  $10^{-20}$  o menor (54). El mercurial puede ser eliminado del complejo mediante un tratamiento con un exceso de tiol de bajo peso molecular; así puede lograrse por ejemplo la reactivación de un enzima que haya sido previamente inactivado por el reactivo.

Los mercuriales orgánicos presentan una banda de absorción en el ultravioleta. El p-HMB (p-hidroximercuribenzoato) absorbe a 233 nm, con un coeficiente de extinción de  $1,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . En la forma combinada con el grupo tiólico, el coeficiente de extinción es mayor:  $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (78).

El uso de los reactivos del grupo sulfhidrilo como agentes modificadores de la nitrato reductasa nos ha permitido estudiar la inactivación por piridín nucleótidos reducidos del enzima modificado químicamente, ya que la ma-

por parte de los reactivos utilizados actúan específicamente sobre la porción diaforásica del complejo y no afectan significativamente a la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa.

Parte de este trabajo se ha publicado ya (22,24) o se encuentra en vías de publicación (80), habiéndose presentado comunicaciones a congresos nacionales (79) e internacionales (50).

## MATERIAL Y METODOS

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO.

El material biológico utilizado fue hojas de espinaca (*Spinacea oleracea*) recolectadas en Gelves (Sevilla). El mismo día de su recolección se lavaron las hojas y se utilizaron inmediatamente o se guardaron en un congelador, donde se mantuvieron a  $-30^{\circ}$  hasta el momento de su utilización.

## 2. PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA.

La nitrato reductasa fue purificada parcialmente mediante dos procedimientos distintos. En los dos casos, todas las operaciones se realizaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### 2.1 PROCEDIMIENTO I

Se utilizó esencialmente el método descrito por Aparicio (5) como se detalla a continuación:

1<sup>º</sup> Preparación del extracto crudo.- Unos 800 g de hojas de espinaca se homogenizan en un mezclador Turmix en presencia de 1200 ml de Tris-ClH 10 mM y cisteína 2 mM. La suspensión resultante se centrifuga a  $27000\times g$  durante 15 minutos con lo que se obtiene un sobrenadante libre de estructuras celulares.

2<sup>º</sup> Eliminación de la ferredoxina.- El sobrenadante anterior se hace pasar por una columna de DEAE-celulosa de 10 cm de altura por 2 cm de diámetro, con lo cual se elimina la fe-

rredoxina, que queda fijada por la columna.

3º Tratamiento con gel de fosfato cálcico.- Al eluato anterior se añade lentamente y con agitación constante una suspensión de gel de fosfato cálcico de 10 mg/ml (20 ml de gel por cada 100 ml de eluato). La suspensión se mantiene durante 10 minutos con agitación ocasional y se centrifuga a 4000xg durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspende en 200 ml de pirofosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), se mantiene durante 10 minutos con agitación ocasional y se centrifuga a 27000xg durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante.

4º Tratamiento con sulfato de protamina.- Al sobrenadante anterior se le añade gota a gota y con agitación constante una solución de sulfato de protamina al 2% (pH 7,0), hasta una concentración final del 1%. La suspensión se mantiene durante 10 minutos con agitación ocasional y se centrifuga a 27000xg durante 10 minutos, desechándose el precipitado.

5º Precipitación con sulfato amónico.- Al sobrenadante anterior se le añade sulfato amónico en polvo hasta el 50% de saturación, se mantiene 10 minutos con agitación ocasional y se centrifuga a 27000xg durante 10 minutos. El precipitado se resuspende en 40 ml de Tris-ClH 10 mM (pH 7,5).

6º Tratamiento con alúmina Cy. A la fracción anterior se le añaden 10 ml de gel de alúmina Cy (10 mg/ml). La suspensión se



deja en reposo 10 minutos con agitación ocasional y se centrifuga a 4500xg durante 5 minutos. El precipitado se resuspende en 15 ml de pirofosfato sódico 0,1 M (pH 7,0), se deja 10 minutos en agitación ocasional y se centrifuga a 27000xg durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido constituye la preparación I de nitrato reductasa, con una actividad específica de 300 mU/mg de proteína.

## 2.2 PROCEDIMIENTO II

1º Preparación del extracto crudo. - Unos 200 g de hojas de espinaca se homogenizan en un mezclador Turmix en presencia de 500 ml de fosfato sódico 0,1 M (pH 7,5),  $\text{NO}_3\text{K}$  10 mM, FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM, obteniéndose una suspensión que se centrifuga a 18000xg durante 15 minutos para eliminar los restos celulares.

2º Precipitación fraccionada con sulfato amónico. - Al sobrenadante anterior se le añade sulfato amónico en polvo hasta un 20% de saturación. La solución resultante se centrifuga a 18000 xg durante 10 minutos y se desecha el precipitado. Al sobrenadante se le añade sulfato amónico en polvo hasta un 45% de saturación, se centrifuga a 18000xg durante 10 minutos y el precipitado resultante se resuspende en 200 ml de fosfato 0,01 M (pH 7,5),  $\text{NO}_3\text{K}$  1 mM, FAD 0,002 mM y EDTA 0,1 mM.

Es imprescindible controlar el pH durante las operaciones

citadas y mantenerlo en 7,5 mediante adición de  $\text{NH}_4\text{OH}$  1N.

3º Tratamiento con gel de fosfato cálcico.- A la fracción anterior se le añade gota a gota y con agitación constante, una suspensión de gel de fosfato cálcico, en la proporción de 1 mg de gel por cada 25 mg de proteína. La suspensión se mantiene durante 10 minutos con agitación ocasional y se centrifuga a 3500xg durante 5 minutos, desechándose el sobrenadante. El precipitado se resuspende en 12 ml de fosfato 0,2 M (pH 7,5),  $\text{NO}_3\text{K}$  10 mM, FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM. La suspensión se mantiene durante 10 minutos en agitación ocasional y se centrifuga a 18000xg durante 10 minutos. El sobrenadante constituye la preparación II de nitrato reductasa, con una actividad específica de 300-600 mU/mg de proteína.

### 3. PREPARACIONES CALENTADAS DE NITRATO REDUCTASA.

Nitrato reductasa calentada ( $\text{NO}_3\text{Rasa-C}$ ).- La preparación enzimática (2 mg de proteína/ml) se calienta a 45°C durante 5 minutos en presencia de fosfato 0,1 M pH 7,5 y EDTA 1 mM.

Nitrato reductasa calentada-FAD ( $\text{NO}_3\text{Rasa-C-FAD}$ ).- La preparación enzimática se calienta a 45°C durante 5 minutos en presencia de fosfato 0,1 M pH 7,5, EDTA 1 mM y FAD 0,02 mM.

#### 4. OBTENCION DE PREPARACIONES MODIFICADAS CON REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILLO

La preparación enzimática se incuba a 30°C con el reactivo durante el tiempo deseado. A continuación se determina la actividad diaforasa y se pasa la preparación por una columna de Sephadex G-25 para eliminar el exceso de reactivo. Cuando se utilizan determinados reactivos (yodoacetato) es necesaria su neutralización previa mediante adición de NaOH 1 N.

#### 5. ENSAYOS ENZIMATICOS

##### 5.1. Actividad NADH-diaforasa

Se determina espectrofotométricamente, midiendo la reducción del citocromo c a 550 nm. La mezcla de reacción contiene, en un volumen total de 2 ml, Tris-ClH 100 mM (pH 7,5), citocromo c 0,06 mM, NADH 0,15 mM y la preparación enzimática.

##### 5.2. Actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa

Se determina colorimétricamente, por aparición de nitrato. La mezcla de reacción contiene, en un volumen total de 1 ml, Tris-ClH 100 mM (pH 7,5), NO<sub>3</sub>K 10 mM, FMN 0,2 mM reducido con S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> (8 mg de S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> en 1 ml de CO<sub>3</sub>HNa de 8 mg/ml) y la preparación enzimática. La mezcla de reacción se mantiene a 30° durante 10 minutos, al cabo de los cuales

se detiene la reacción mediante agitación en un ciclomixer hasta que aparece el color del FMN oxidado (12).

A continuación, se añaden a la mezcla 1 ml de reactivo de sulfanilamida y 1 ml de N-naftil-etilendiamina (81), se completa con agua hasta 5 ml y se deja desarrollar el color durante 10 minutos antes de medir la D.O. a 540 nm en un fotocolorímetro.

### 5.3. Actividad NADH-nitrato reductasa

Se ensayó por dos procedimientos:

#### a) Por aparición de nitrito

La mezcla de reacción contiene, en un volumen total 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. La mezcla se mantiene durante 10 minutos a 30°C, al cabo de los cuales se detiene la reacción añadiendo 1 ml de reactivo de sulfanilamida y 1 ml de reactivo de N-naftil-etilendiamina. A continuación, se completa con agua hasta 5 ml y se deja desarrollar el color antes de la lectura en el fotocolorímetro.

#### b) Espectrofotométricamente

Se mide la oxidación del NADH a 340 nm. La mezcla de reacción contiene, en un volumen total de 2 ml, Tris-ClH 100 mM (pH 7,5), NADH 0,15 mM,  $\text{NO}_3\text{K}$  10 mM y la preparación enzimática.

La actividad específica se expresa en micromoles de nitrato reducido por minuto y por mg de proteína a 30°C.

Cuando la preparación cuya actividad se quiere determinar contiene  $\text{NO}_3\text{K}$ , la actividad NADH-nitrato reductasa se determina espectrofotométricamente, al objeto de que el nitrato que aparece durante la incubación con NADH no interfiera en la determinación (vease RESULTADOS, tabla II).

## 6. METODOS ANALITICOS.

### 6.1 Determinación de proteína.

En las preparaciones que no contienen FAD, la proteína se determina por el método de Warburg y Christian (82), y en las que contienen FAD, por el método de Lowry (83).

### 6.2 Determinaciones espectrofotométricas.

La reducción del citocromo c y la oxidación del NADH y del NADPH se midieron a 550 y 340 nm respectivamente. Los coeficientes de extinción son, para el NAD(P)H  $E_{1\text{cm}}^{\text{mM}} = 6,3$  y para el citocromo c  $E_{1\text{cm}}^{\text{mM}} = 28$ .

## 7. REACTIVOS.

### 7.1 Preparación del gel de fosfato cálcico.

Se prepara según el procedimiento descrito por Wood (84):

Se añaden 150 ml de una solución de  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (88 g de  $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ ) a 160 ml de agua destilada. A continuación se añaden 150 ml de fosfato trisódico (152 g de  $\text{PO}_4\text{Na}_3 \cdot 12\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ ) con agitación constante y se ajusta el pH a 7,4 con ácido acético 1N. El precipitado obtenido se lava cinco veces con agua destilada, se centrifuga y se resuspende en agua destilada hasta una concentración final de 10 mg/ml.

#### 7.2 Productos químicos.

NAD(P)H,  $\text{NAD}^+$ , FMN, p-HMB, p-HMBS, DTNB, NEM, yodoacetato, yodoacetamida, citocromo c y sulfato de protamina fueron suministrados por SIGMA, St Louis (USA). El DTE, por SERVA Heidelberg (Alemania). El cianuro y ferricianuro potásicos, la cisteína y el EDTA, por MERCK, Darmstadt (Alemania). El azul dextrano y el Sephadex, por PHARMACIA, Uppsala (Suecia). Todos los demás reactivos eran de grado analítico.

El agua utilizada para las soluciones, lavados de material, etc fue desionizada por cambio iónico en un desmineralizador SETA tipo R100 serie 2/67.

#### 8. APARATOS.

Las medidas de nítrito se realizaron en fotocolorímetros BAUSCH&LOMB modelos Spectronic 20 o 700.

Las medidas de pH se realizaron en un aparato medidor de pH Methrom modelo E-512.

Las determinaciones espectrofotométricas se realizaron en espectrofotómetros BECKMAN DK-2A y PYE UNICAM SP 1800.

Se utilizaron columnas suministradas por PHARMACIA, Uppsala, Suecia.

Para los pasos de purificación se emplearon centrífugas SORVALL RC2B y BECKMAN modelo J2-1B.

## RESULTADOS



## 1. INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS.

### 1.1 INACTIVACION REVERSIBLE POR NAD(P)H.

La nitrato reductasa de espinaca se inactiva reversiblemente en presencia de NADH o NADPH. Como se muestra en la tabla I, las distintas actividades del complejo se afectan de forma distinta: después de la incubación con NADH o NADPH, el complejo carece prácticamente de las actividades NADH-nitrato reductasa y  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa, mientras que la actividad NADH-diaforasa no se afecta. Estos resultados indican que la inactivación tiene lugar en la segunda mitad del complejo.

La nitrato reductasa inactivada por NAD(P)H se reactiva por el ferricianuro. Como se ve en la tabla I, el ferricianuro produce casi la completa reactivación de la NADH-nitrato reductasa y  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa inactivadas por NADH o NADPH.

### 1.2 INACTIVACION POR NAD(P)H DE PREPARACIONES CALENTADAS DE NITRATO REDUCTASA.

#### 1.2.1 Inactivación por NAD(P)H de una preparación calentada en ausencia de FAD.

La figura 1 muestra el efecto del NADH y del NADPH sobre una preparación nativa de nitrato reductasa (razón de NADH-

TABLA I

EFFECTO DEL NAD(P)H SOBRE LAS TRES ACTIVIDADES DEL COMPLEJO  
NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA

Adición	Actividades relativas (%)				
		NADH-NO <sub>3</sub> Rasa		FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa	NADH-diaforasa
		Tratada con FeCl (1)		Tratada con FeCl (1)	
Ninguna	88	90	94	92	89
NADH	7	89	11	86	110
NADPH	8	87	18	88	100

La nitrato reductasa\* (0,2 mg/ml) fue incubada a 25°C durante 135 minutos en presencia de Tris-ClH 0,5 M (pH 7,5), ClNa 0,2 M, FAD 0,01 mM y los reactivos indicados en la tabla a las concentraciones siguientes: NADH 0,5 mM y NADPH 0,5 mM.

Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación, y se expresan como porcentajes de las actividades correspondientes del control sin adiciones al tiempo cero.

(1) Las alícuotas tomadas de las mezclas de incubación se trataron con Ferricianuro 0,3 mM durante 2 minutos antes de la determinación de actividades. En las alícuotas que contienen NADH se añadió una cantidad suplementaria de ferricianuro, ya que éste es reducido enzimáticamente por el NADH en presencia de nitrato reductasa.

(\*) Preparación I

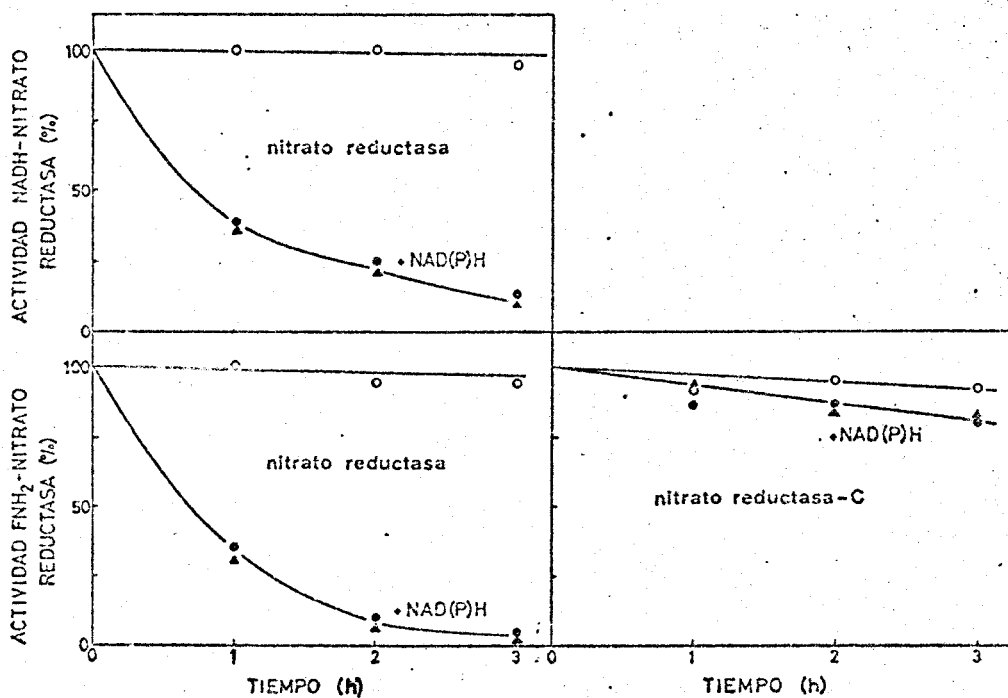


Fig. 1. EFECTO DEL NAD(P)H SOBRE DIFERENTES PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA.

La nitrato reductasa (preparación 1, 0,1 mg/ml; razón de actividades NADH-NO<sub>3</sub>Rasa/FNH<sub>2</sub>-NO<sub>3</sub>Rasa igual a 0,56) y la nitrato reductasa-C (preparación 1, 0,1 mg/ml, razón de actividades NADH-NO<sub>3</sub>Rasa/FNH<sub>2</sub>-NO<sub>3</sub>Rasa igual a 0,05) se incubaron a 25°C en presencia de Tris-ClH 0,5 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y los siguientes reactivos: ninguno (O), NADH 0,5 mM (●) y NADPH 0,5 mM (▲). Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación a los tiempos indicados.

nitrito reductasa a FNH<sub>2</sub>-nitrito reductasa alta} y una preparación calentada a 45°C durante 5 minutos en ausencia de FAD (nitrito reductasa-C, razón de NADH-nitrito reductasa a FNH<sub>2</sub>-nitrito reductasa baja). Después de tres horas de incubación, tanto el NADH como el NADPH producen la casi completa inactivación de las actividades NADH-nitrito reductasa y FNH<sub>2</sub>-nitrito reductasa de la preparación nativa, mientras que la preparación calentada sufre sólo una pequeña inactivación de la FNH<sub>2</sub>-nitrito reductasa.

Algunas preparaciones que se mantuvieron a 0-5°C en ausencia de FAD u otro agente protector y que perdían espontáneamente la actividad diaforasa, tampoco pueden ser inactivadas por NADH o NADPH.

### 1.2.2 Inactivación por NAD(P)H de una preparación calentada en presencia de FAD.

El FAD es un compuesto que protege la actividad NADH-diaforasa de la desnaturalización térmica. La preparación calentada en presencia de FAD (nitrito reductasa-C-FAD, razón de NADH-nitrito reductasa a FNH<sub>2</sub>-nitrito reductasa alta} se inactiva por NADH o NADPH a la misma velocidad y en el mismo grado que la preparación nativa. Las figuras 2 y 3 muestran la inactivación por NADH y NADPH respectivamente de una preparación nativa y otra calentada en presencia de FAD.

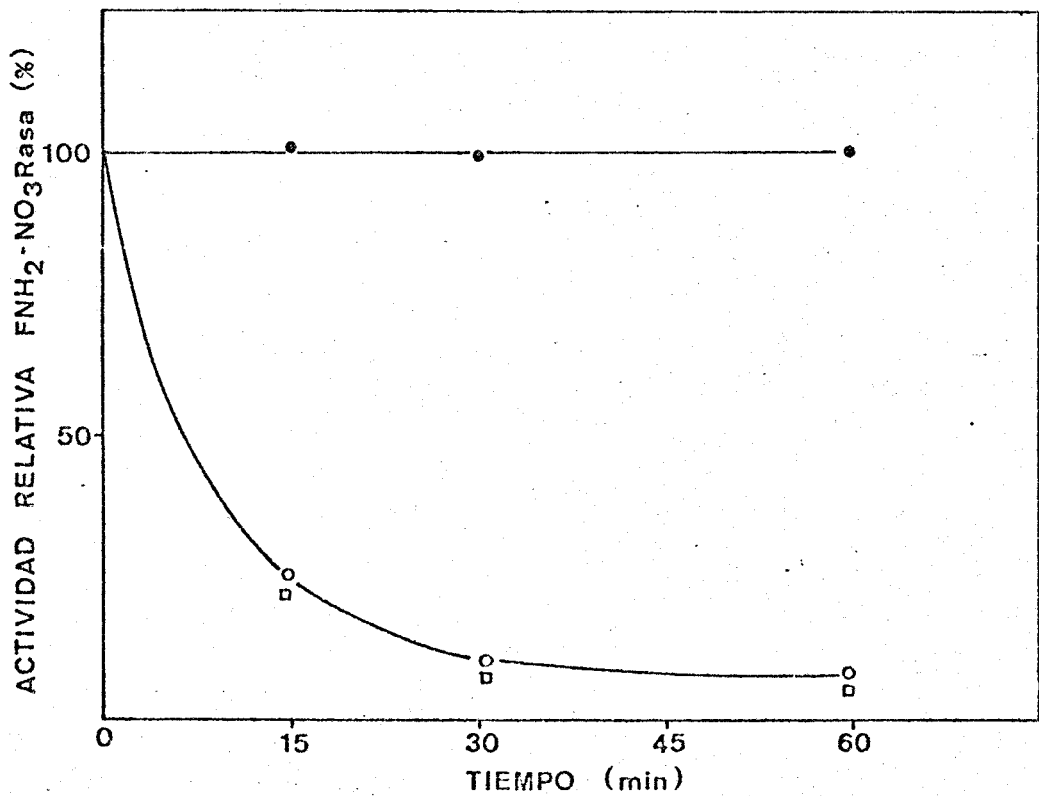


Fig.2. EFECTO DEL NADH SOBRE DIFERENTES PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA.

La nitrato reductasa\* nativa (O) (preparación 11,2 mg/ml), la nitrato reductasa-C (●) (preparación 11,2 mg/ml) y la nitrato reductasa-C-FAD (□) (preparación 11,2 mg/ml), se incubaron a 30°C durante 60 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y NADH 0,5 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación a los tiempos indicados.

(\* ) Preparación 11

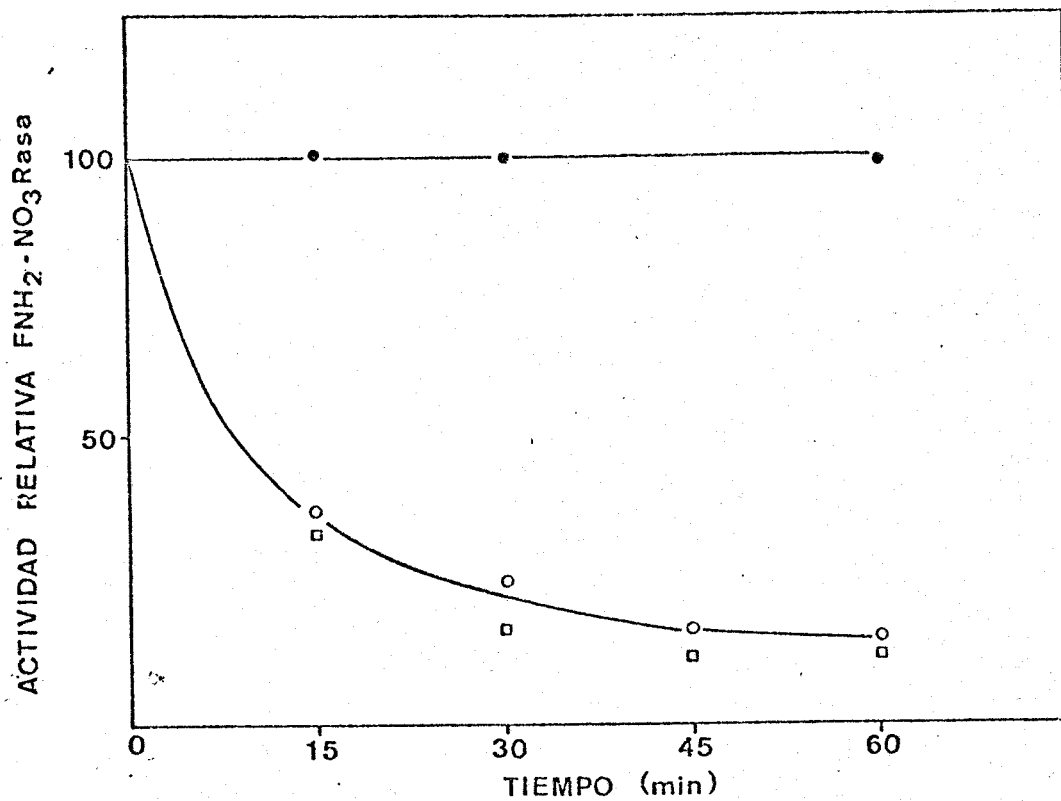


Fig. 3. EFECTO DEL NADPH SOBRE DIFERENTES PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA.

El experimento se realizó como se describe en la leyenda de la Figura 2, pero usando NADPH en lugar de NADH.

Estos experimentos sugieren, en principio, que se requiere la funcionalidad de la porción diaforásica para que pueda tener lugar la inactivación de la nitrato reductasa por los piridín nucleótidos reducidos.

### 1.3 EFECTO DEL NITRATO SOBRE LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR NAD(P)H.

El nitrato protege a la nitrato reductasa de la inactivación por NADH o NADPH. Como se muestra en la tabla II, la protección frente al NADH es similar a la obtenida frente al NADPH, lo que indica que la presencia de nitrato afecta de la misma forma a las inactivaciones producidas por ambos nucleótidos.

## 2. INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILO.

### 2.1 EFECTO DE LOS REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILO SOBRE LAS TRES ACTIVIDADES DEL COMPLEJO.

La nitrato reductasa se inactiva en presencia de reactivos del grupo sulfhidriilo. La sensibilidad de cada una de las actividades del complejo frente a dichos reactivos depende del reactivo utilizado y de su concentración. En la tabla III

TABLA II

EFFECTO DEL NITRATO EN LA INACTIVACION POR NAD(P)H DE LA  
 $\text{FNH}_2$ -NITRATO REDUCTASA

Adición	Actividad relativa NADH- $\text{NO}_3$ Rasa
Ninguna	100
NADH	20
NADH, nitrato	90
NADPH	33
NADPH, nitrato	85

La nitrato reductasa\* (0,2 mg/ml) fue incubada a 25°C durante 5 h en presencia de Tris-ClH 0,5 M (pH 7,5), ClNa 0,2 M, FAD 0,01 mM y los reactivos indicados a las concentraciones siguientes: NADH 0,5 mM, NADPH 0,5 mM, y nitrato potásico 10 mM. Después de la incubación, las actividades enzimáticas fueron determinadas en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\*) Preparación I



se observa como el p-HMB, el DTNB y el yodoacetato afectan preferentemente a las actividades NADH-diaforasa y NADH-nitrato reductasa. Por el contrario, la yodoacetamida y la NEM afectan también a la actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa.

Un reactivo específico de la diaforasa como el p-HMB puede afectar también a la segunda porción del complejo. La figura 4 muestra como la actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se afecta a concentraciones de p-HMB superiores a 50 nmoles por mg de proteína. Sin embargo, tanto la diaforasa como la NADH-nitrato reductasa se inactivan a concentraciones diez veces más bajas del reactivo.

## 2.2. REACTIVACION POR DTE DE LA NITRATO REDUCTASA TRATADA CON MERCURIALES

Las preparaciones de nitrato reductasa inactivadas por p-HMB y p-HMBS pueden reactivarse en presencia de tioles simples (DTE). La Tabla IV muestra la reactivación de las tres actividades del complejo en presencia de DTE y FAD. Tanto la NADH-nitrato reductasa como la FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se reactivaron sólo parcialmente mientras que la NADH-diaforasa se reactivó en un 100%.

Para la determinación de la actividad diaforasa en las preparaciones tratadas con DTE, es imprescindible eliminar el exceso de tior, ya que el DTE reduce químicamente al cito

TABLA III

EFFECTO DE DIFERENTES REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILLO SOBRE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS DEL COMPLEJO NITRATO REDUCTASA

Adición	Actividades relativas (%)		
	NADH- NO <sub>3</sub> Rasa	NADH- diaforasa	FNH <sub>2</sub> - NO <sub>3</sub> Rasa
p-HMB (0,05 mM)	5	1	85
DTNB (0,1 mM)	5	1	80
Yodoacetato (100 mM)	7	1	90
Yodoacetamida (100 mM)	49	40	70
NEM (2 mM)	5	1	60

La nitrato reductasa\* (2 mg/ml) se incubó a 30°C en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y los reactivos indicados en la tabla durante los tiempos siguientes: p-HMB 10 minutos; DTNB 1 hora; yodoacetato, yodoacetamida y NEM, 3 horas.

Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación, y se expresan como porcentajes del control sin adiciones después del correspondiente tiempo de incubación.

(\*) Preparación II

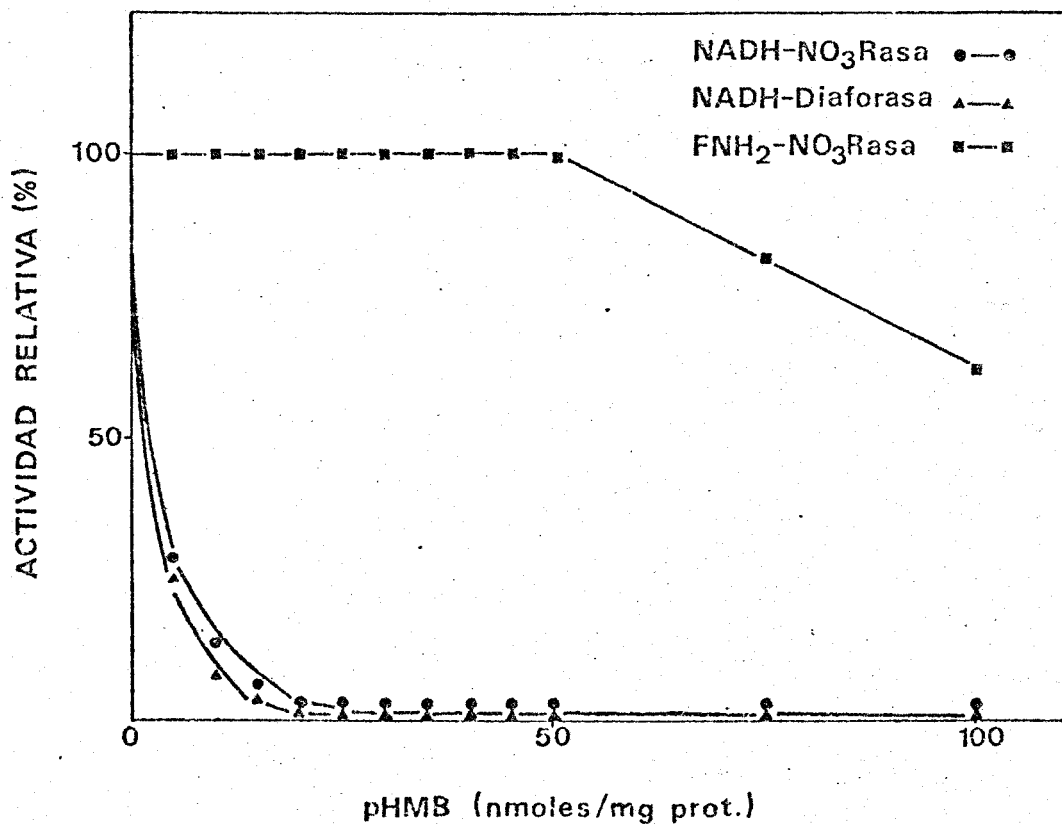


Fig. 4. EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE p-HMB SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO NITRATO REDUCTASA.

La nitrato reductasa\* (2mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB a las concentraciones indicadas. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\*) Preparación II

TABLA IV

REACTIVACION POR DTE DE PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA  
INACTIVADAS POR p-HMB Y p-HMBS

Adición	Actividades relativas					
	NADH-diaforasa		FNH <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> Rasa		NADH-NO <sub>3</sub> Rasa	
	Tratado con DTE (1)	Tratado con DTE (1)	Tratado con DTE (1)	Tratado con DTE (1)	Tratado con DTE (1)	Tratado con DTE (1)
Ninguna	100	120	100	95	100	92
p-HMB 0,2 mM	1	100	67	90	5	60
p-HMBS 0,5 mM	1	100	40	85	5	40

La nitrato reductasa\* (2 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y los reactivos indicados en la tabla.

(1) Las preparaciones inactivadas total o parcialmente se incubaron a 30°C durante 5 minutos en presencia de DTE 1 mM; al cabo de este tiempo se pasaron por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM para eliminar el exceso de DTE y a continuación, se determinaron las actividades enzimáticas.

(\*) Preparación II

óromo c.

La reactivación de la actividad NADH-diaforasa por DTE requiere FAD. La Tabla V muestra como se consiguió sólo una reactivación parcial en ausencia de FAD, mientras que en presencia de FAD la reactivación era casi total.

Es necesario que el FAD esté presente para reactivar con DTE la preparación inactivada. Por otra parte, una preparación inactivada por p-HMB e incubada con DTE en ausencia de FAD, no se reactiva incluso si la preparación (ya eliminado el exceso de DTE) se incubaba con FAD o se añade el FAD a la mezcla de ensayo de la actividad diaforasa.

La reactivación por DTE de la NADH-nitrato reductasa y FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa no requiere FAD. En la Tabla VI se observa que la reactivación por DTE de dichas actividades tenía lugar tanto en ausencia como en presencia de FAD.

### 2.3. PROTECCION POR ALGUNOS COMPUESTOS DE LA INACTIVACION DE LA DIAFORASA POR REACTIVOS DEL GRUPO SULFHIDRILO.

#### 2.3.1. PROTECCION POR NADH Y FAD DE LA INACTIVACION POR MERCURIALES.

El NADH y el FAD protegen la actividad NADH-diaforasa de la inactivación por p-HMB y p-HMBS. Las Tablas VII y VIII

TABLA V

REACTIVACION POR DTE DE LA NADH-DIAFORASA EN PRESENCIA Y  
AUSENCIA DE FAD

Tratamiento con DTE	NADH-diaforasa (Actividad relativa)	
	Antes del tratamiento con DTE	Después del tratamiento con DTE
En ausencia de FAD	1	30
En presencia de FAD	1	70

La nitrato reductasa\* (5 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM y p-HMB (30 nmoles/mg de proteína). Después de este tratamiento, el enzima se incubó a 30°C con DTE 1 mM en presencia y ausencia de FAD 0,2 mM. Después de 15 minutos de incubación, la preparación se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), y EDTA 1 mM. La actividad NADH-diaforasa se determinó antes de la adición de DTE y después de la elución de la columna. Las actividades se expresan como porcentajes de la actividad de una preparación que no se incubó con p-HMB.

(\* ) Preparación II

TABLA VI

EFFECTO DEL FAD SOBRE LA REACTIVACION POR DTE DE LA NADH-NITRATO REDUCTASA Y LA FNH<sub>2</sub>-NITRATO REDUCTASA

Adición	Actividades relativas			
	NADH-NO <sub>3</sub> Rasa		FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa	
	Tratado con DTE (1)		Tratado con DTE (1)	
Ninguna	100	95	100	92
p-HMB	67	90	6	65
p-HMB, FAD	65	91	5	60

La nitrato reductasa\*(5 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, p-HMB (100 nmol/mg de proteína) y, en su caso, FAD 0,2 mM.

(1) Las preparaciones inactivadas se incubaron en presencia de DTE a 30°C durante 5 minutos, al cabo de los cuales se pasaron por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM para eliminar el exceso de DTE.

(\*) Preparación II

muestran el efecto protector de ambos nucleótidos. Este efecto protector dependía de ciertas condiciones experimentales tales como la concentración del nucleótido y la relación entre la concentración del mercurial y la concentración de proteína.

Otros nucleótidos y sustratos probados (NADPH, FMN y  $\text{NO}_3\text{K}$ ) no ejercieron ningún efecto protector de la diaforasa frente a la inactivación por mercuriales en las condiciones ensayadas.

#### 2.3.2. PROTECCION POR NADH Y FAD DE LA INACTIVACION POR YODOACETATO.

El NADH y el FAD protegen la actividad NADH-diaforasa de la inactivación por yodoacetato. En la Tabla IX se observa la protección por ambos nucleótidos, mientras que otros compuestos probados (NADPH, FMN y  $\text{NO}_3\text{K}$ ) no ejercieron ningún efecto protector.

#### 2.3.3. PROTECCION POR FAD, $\text{NO}_3\text{K}$ Y NADH DE LA INACTIVACION POR NEM.

El FAD y el NADH protegen la actividad NADH diaforasa de la inactivación por NEM. El nitrato potásico protege parcialmente la actividad  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa de la



TABLA VII

EFFECTO DE ALGUNOS COMPUESTOS SOBRE LA INACTIVACION POR  
p-HMB DE LA NADH-DIAFORASA

Adición	NADH-diaforasa (Actividad relativa)
Ninguna	100
p-HMB 0,05 mM	10
p-HMB 0,05 mM, FAD 1 mM	80
p-HMB 0,05 mM, NADH 0,3 mM	90

La preparación enzimática\* (5 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5) EDTA 1 mM y los reactivos indicados en la tabla. Inmediatamente después de la incubación, se determinaron las actividades enzimáticas en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\*) Preparación II

TABLA VIII

EFFECTO DE ALGUNOS COMPUESTOS SOBRE LA INACTIVACION POR  
p-HMBS DE LA NADH-DIAFORASA

Adición	NADH-diaforasa (Actividad relativa)
Ninguna	100
p-HMBS 0,4 mM	10
p-HMBS 0,4 mM, FAD 1 mM	40
p-HMB 0,4 mM, NADH 0,5 mM	60

La preparación enzimática\* (10 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y los reactivos indicados en la tabla. Inmediatamente después de la incubación se tomaron alícuotas en las que se determinó la actividad NADH-diaforasa.

(\* ) Preparación II

TABLA IX

EFFECTO DE ALGUNOS COMPUESTOS SOBRE LA INACTIVACION POR YODO-  
ACETATO DE LA NADH-DIAFORASA

Adición	NADH-diaforasa (Actividad relativa)
Ninguna	100
yodoacetato 100 mM	40
yodoacetato 100 mM, FAD 1 mM	70
yodoacetato 100 mM, NADH 0,3 mM	70

La preparación enzimática\* (2 mg/ml) se incubó a 30°C durante 1 hora en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM y los reactivos indicados a las concentraciones descritas en la tabla.

Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\*) Preparación II

Inactivación por NEM. En la Tabla X se muestra el efecto protector del FAD frente a la inactivación por NEM. Se observa que el efecto del NADH es poco intenso y que el nitrato ejerce su efecto a nivel de la segunda porción del complejo.

Otros compuestos probados como el NADPH y el FMN no ejercieron ningún efecto protector frente a la inactivación por NEM en las condiciones ensayadas.

Ninguno de los compuestos probados (NADH, NADPH, FAD, FMN,  $\text{NO}_3\text{K}$ ) tiene ningún efecto en la inactivación por DTNB de la nitrato reductasa, al menos en las condiciones experimentales probadas.

### 3. INACTIVACION POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS DE LA NITRATO REDUCTASA MODIFICADA POR REACTIVOS DEL GRUPO SULFIDRILLO.

#### 3.1. INACTIVACION POR NADH DE LA NITRATO REDUCTASA MODIFICADA.

Sabemos que la nitrato reductasa calentada en ausencia de FAD, que carece de la actividad diaforasa, no se inactiva en presencia de NADH. Sin embargo, preparaciones de nitrato reductasa desprovistas de actividad diaforasa mediante un tratamiento con reactivos del grupo sulfhidri

TABLA X

EFFECTO DE ALGUNOS COMPUESTOS SOBRE LA INACTIVACION POR NEM  
DE LA NITRATO REDUCTASA

Adición	Actividades relativas (%)		
	NADH-diaforasa	$\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa	NADH- $\text{NO}_3$ Rasa
Ninguna	100	100	100
NEM 6 mM	1	35	5
NEM 6 mM, NADH 0,6 mM	30	5	5
NEM 6 mM, FAD 2 mM	70	30	30
NEM 6 mM, $\text{NO}_3\text{K}$ 20 mM	1	56	5

La nitrato reductasa\* (5 mg/ml) se incubó a 30°C durante 20 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM y los reactivos indicados a las concentraciones descritas en la tabla. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\*) Preparación II

lo, son susceptibles de inactivarse en presencia de NADH.

### 3.1.1. INACTIVACION POR NADH DE LA NITRATO REDUCTASA TRATADA CON YODOACETATO.

Una preparación de nitrato reductasa tratada con yodoacetato y que carece por tanto de actividad diaforasa puede ser inactivada por NADH. La Tabla XI muestra como una preparación tratada con yodoacetato se inactivó en presencia de NADH casi en el mismo grado en que lo hizo una preparación nativa.

### 3.1.2. INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION TRATADA CON DTNB.

Una preparación de nitrato reductasa tratada con DTNB y que carece por tanto de actividad diaforasa puede ser inactivada parcialmente por el NADH.

La Tabla XII muestra como la preparación tratada con DTNB se inactivó por NADH solo parcialmente, si se compara con la inactivación que sufre una preparación nativa.

TABLA XI

INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION DE NITRATO REDUCTASA  
TRATADA CON YODOACETATO

Preparación	Adición	Actividades relativas	
		NADH-diaforasa	$\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
No tratada	Ninguna	100	100
	NADH	100	15
Tratada con Yodoacetato	Ninguna	1	100
	NADH	1	33

La preparación tratada con yodoacetato se obtuvo incubando la nitrato reductasa\* (3 mg/ml) a 30°C durante 4 horas en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5) FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y yodoacetato 100 mM. A continuación se pasó la preparación por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5) FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM, y se determinó la actividad diaforasa de la preparación eluida de la columna. Una preparación nativa y la preparación anterior se incubaron a 30°C durante 60 minutos en presencia de NADH 0,5 mM, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas en las que se determinaron las actividades  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. No se observó reactivación de la diaforasa a lo largo de la incubación con NADH.

(\*) Preparación II

TABLA XII

INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION DE NITRATO REDUCTASA  
TRATADA CON DTNB

Preparación	Adición	Actividades relativas	
		NADH-diaforasa	$\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
No tratada	Ninguna	100	100
	NADH	100	15
Tratada con DTNB	Ninguna	1	100
	NADH	1	50

La preparación tratada con DTNB se obtuvo incubando la nitrato reductasa\* (3 mg/ml) a 30°C durante 30 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5) FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y DTNB 0,1 mM. A continuación se pasó la preparación por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM y se determinó la actividad diaforasa.

La preparación anterior y una preparación nativa se incubaron a 30°C durante 60 minutos en presencia de NADH 0,5 mM, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas en las cuales se determinaron las actividades  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. No se observó reactivación de la diaforasa a lo largo de esta incubación.

(\*) Preparación II



### 3.1.3. INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION TRATADA CON p-HMB.

Una preparación de nitrato reductasa que carezca de actividad diaforasa por tratamiento con p-HMB, puede ser inactivada perfectamente por el NADH. La Tabla XIII muestra como una preparación tratada con p-HMB se inactivó en el mismo grado en que lo hizo una preparación nativa.

Las Figuras 5 y 6 muestran la inactivación por NADH a distintos tiempos de una preparación nativa y una preparación tratada con p-HMB. Se observa que la cinética de inactivación es idéntica en los dos casos, así como el tiempo requerido para la inactivación total de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa.

La Tabla XIV muestra la inactivación por NADH de tres preparaciones de nitrato reductasa. La preparación nativa y la preparación tratada con p-HMB se inactivaron en el mismo grado a pesar de que ésta carecía de actividad diaforasa; sin embargo, una preparación calentada a  $45^\circ\text{C}$  en ausencia de FAD, que también carecía de actividad diaforasa no se inactivó en absoluto.

Las tres preparaciones antes citadas (nativa, tratada con p-HMB y calentada en ausencia de FAD) se comportan frente a la inactivación por NADH y CNK de la misma

TABLA XIII

INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION DE NITRATO REDUCTASA  
TRATADA CON p-HMB

Preparación	Adición	Actividades relativas	
		NADH-diaforasa	$\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
No tratada	Ninguna	100	100
	NADH	100	5
Tratada con p-HMB	Ninguna	1	100
	NADH	1	5

La preparación tratada con p-HMB se obtuvo incubando la nitrato reductasa\* (3 mg/ml) a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB (15 nmoles/mg de proteína). A continuación se pasó la preparación por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM y se determinó la actividad diaforasa. La preparación anterior y una preparación nativa se incubaron a 30°C en presencia de NADH 0,5 mM durante 60 minutos, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas en las cuales se determinaron las actividades  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. A lo largo de esta incubación no se observó reactivación de la actividad diaforasa.

(\* ) Preparación II

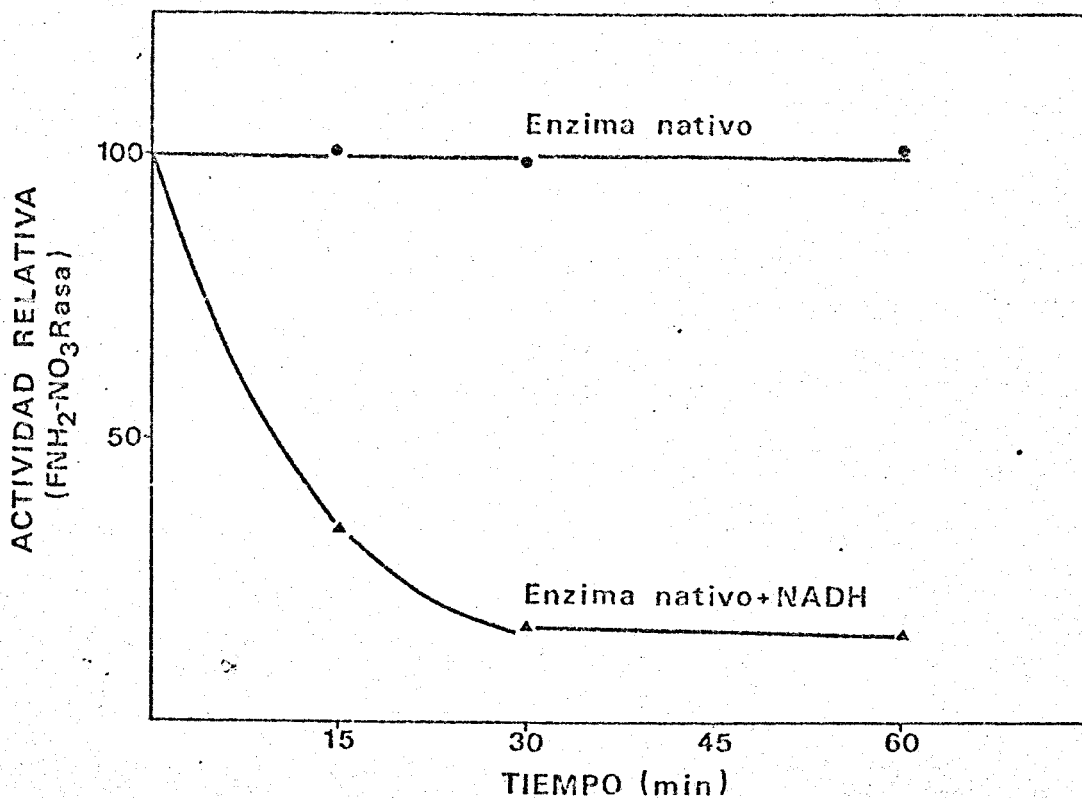


Fig. 5. INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION NATIVA DE NITRATO REDUCTASA.

La preparación enzimática\* (2 mg de proteína/ml) se incubó a 30°C en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM, con (▲) y sin (●) NADH 0,5 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación a los tiempos indicados.

(\*) Preparación II

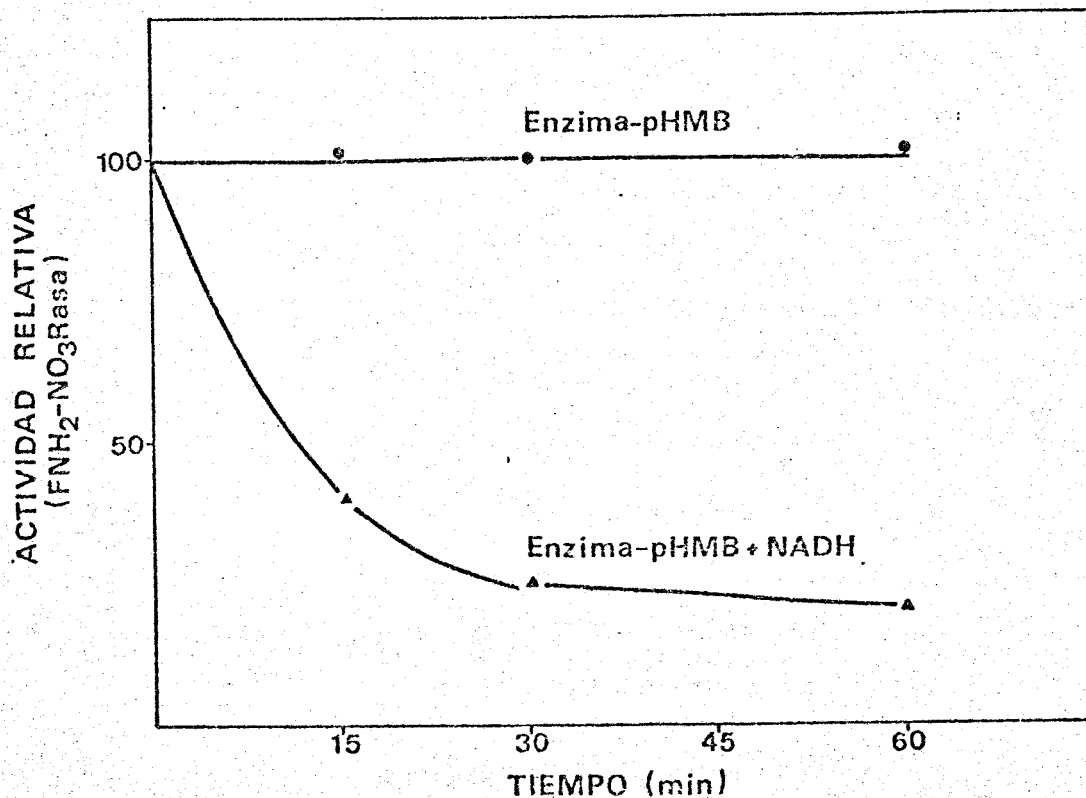


Fig. 6. INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION TRATADA CON p-HMB.

La preparación enzimática\* (2 mg de proteína/ml), se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB (20 nmoles/mg de proteína). A continuación se pasó la preparación por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM al objeto de eliminar el exceso de reactivo. La preparación filtrada, se incubó a 30°C en presencia de NADH 0,5 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas en las que se determinó la actividad FNH<sub>2</sub>-nitrate reductasa.

(\*) Preparación II

TABLA XIV

INACTIVACION POR NADH DE DIFERENTES PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA

Preparación	Adición	Actividades relativas	
		NADH-diaforasa	$\text{FNH}_2\text{-NO}_3^{\text{Rasa}}$
No tratada	Ninguna	100	100
	NADH	100	5
Calentada	Ninguna	5	100
	NADH	5	95
Tratada con p-HMB	Ninguna	1	100
	NADH	1	13

La preparación calentada se obtuvo incubando la nitrato reductasa\* (3 mg/ml) a 45°C durante 5 minutos en ausencia de FAD, al cabo de los cuales se determinó la actividad diaforasa. La preparación tratada con p-HMB se obtuvo incubando el enzima (3 mg de proteína/ml) a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB (15 nmoles/mg de proteína). Esta preparación se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM y se determinó la actividad diaforasa.

Las dos preparaciones anteriores y una preparación nativa se incubaron a 30°C en presencia de fosfato 0,1 mM (pH 7,5) FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM con y sin NADH 0,5 mM durante 60 minutos, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas en las que se determinaron las actividades  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa.

(\*) Preparación II

forma que frente al NADH sólo: la Tabla XV muestra como la preparación nativa y la preparación tratada con p-HMB se inactivaron en presencia de NADH y CNK mientras que la preparación calentada no se inactivó.

#### 3.1.4. INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION TRATADA CON p-HMBS.

Una preparación de nitrato reductasa tratada con p-HMBS, a pesar de carecer de actividad diaforasa, puede ser inactivada por NADH. En la Tabla XVI se observa la inactivación por NADH de una preparación tratada con p-HMBS: la preparación tratada se inactivó en el mismo grado que una preparación nativa.

### 3.2. INACTIVACION POR NADPH DE LA NITRATO REDUCTASA.

#### 3.2.1. INACTIVACION POR NADPH DE LA NITRATO REDUCTASA TRATADA CON MERCURIALES.

La Figura 7 muestra la inactivación por NADPH de una preparación tratada con p-HMB. Se observa que la preparación tratada no se inactivó en presencia de una concentración de NADPH que inactiva perfectamente a una preparación nativa. Es necesario subir esta concentración 10 ó

TABLA XV

INACTIVACION POR NADH Y CNK DE DIFERENTES PREPARACIONES DE  
NITRATO REDUCTASA

Preparación	Adición	Actividad relativa	
		NADH-diaforasa	$\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
No tratada	Ninguna	100	100
	NADH, CNK	100	1
Calentada	Ninguna	1	100
	NADH, CNK	1	80
Tratada con p-HMB	Ninguna	1	100
	NADH, CNK	1	10

La preparación calentada se obtuvo incubando la nitrato reductasa\* (3 mg/ml) a 45°C durante 5 minutos en ausencia de FAD.

La preparación tratada con p-HMB se obtuvo incubando el enzima (3 mg de proteína/ml) a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB (15 nmoles/mg de proteína). A continuación se pasó la preparación por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM y se determinó la actividad diaforasa.

Una preparación nativa y las dos preparaciones anteriores se incubaron a 30°C en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5) FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM con y sin NADH 0,5 mM más CNK 0,001 mM durante 10 minutos, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas en las que se determinaron las actividades  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa.

(\*) Preparación II

TABLA XVI

INACTIVACION POR NAD(P)H DE UNA PREPARACION DE NITRATO REDUCTASA TRATADA CON p-HMBS

Preparación	Adición	Actividades relativas	
		NADH-diaforasa	$\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
No tratada	Ninguna	100	100
	NADH (0,5 mM)	100	5
	NADPH(0,5 mM)	100	5
Tratada con p-HMBS	Ninguna	1	100
	NADH (0,5 mM)	1	5
	NADPH(0,5 mM)	1	25

La preparación tratada con p-HMBS se obtuvo incubando la nitrato reductasa\* (3 mg/ml) a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMBS (15 nmoles/mg de proteína). A continuación se pasó la preparación por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM y se determinó la actividad diaforasa.

Una preparación nativa y la preparación tratada con p-HMBS se incubaron a 30°C en presencia de los compuestos citados en la tabla durante 60 minutos, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas en las que se determinaron las actividades  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa.

(\*) Preparación II



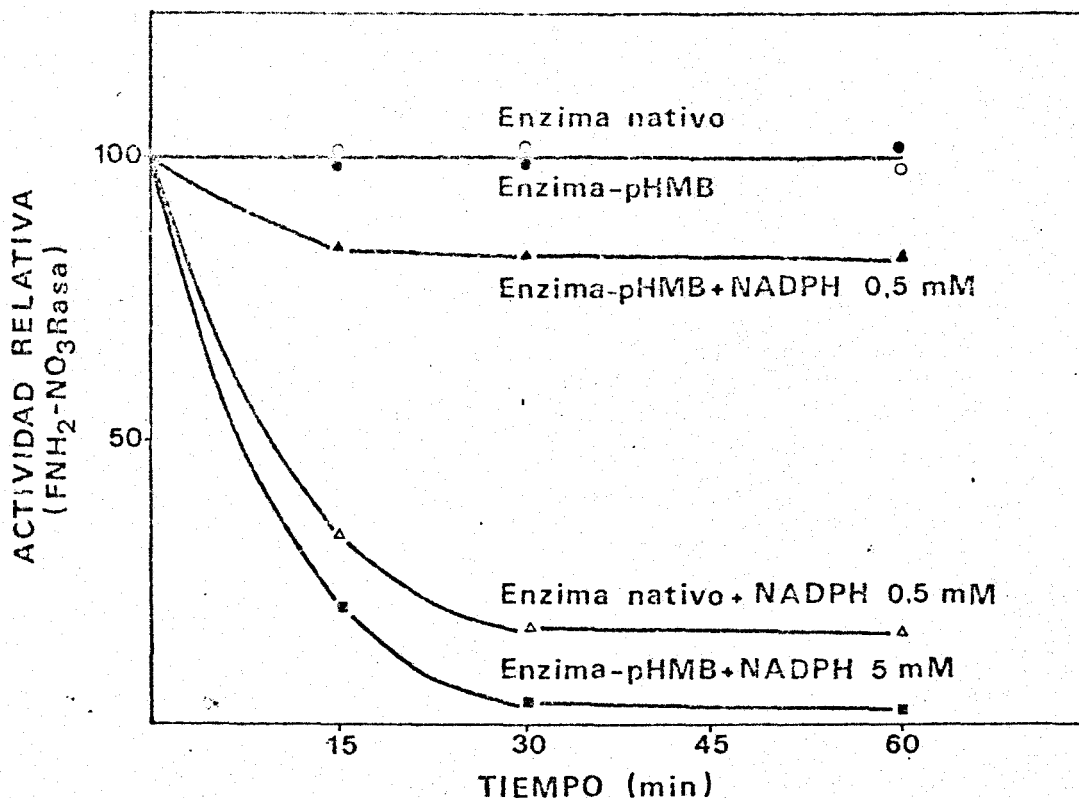


Fig. 7. INACTIVACION POR NADPH DE UNA PREPARACION NATIVA Y UNA PREPARACION TRATADA CON p-HMB.

La nitrato reductasa\* (2mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB (20 nmoles/ mg de proteína).

La preparación tratada y una preparación nativa se pasaron por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM. Ambas preparaciones se incubaron a 30°C en presencia de los compuestos indicados. A tiempos distintos se tomaron alícuotas en las que se determinaron las actividades enzimáticas.

(\*) Preparación II

20 veces para que la preparación tratada con p-HMB pueda inactivarse.

El efecto de la concentración de NADPH en la inactivación de una preparación tratada con p-HMB se muestra en la Figura 8: la inactivación aumenta al aumentar la concentración de NADPH.

Por otra parte, la Figura 9 muestra la actividad NADPH oxidasa de una preparación nativa y de una preparación tratada con p-HMB: se ve perfectamente que la actividad NADPH-oxidasa de las dos preparaciones es semejante, que depende de FAD y que es demasiado lenta como para oxidar a todo el NADPH que se pone en la mezcla de incubación (0,5  $\mu$ moles/ml). Como se ve en la Figura 9, el descenso de D.O. a 340 nm corresponde a unos 0,05  $\mu$ moles de NADPH.

La inactivación por NADH de una preparación de nitrato reductasa tratada con p-HMBS tampoco es semejante a la inactivación por NADPH de una preparación nativa. La Tabla XVI muestra como una preparación tratada con p-HMBS se inactiva sólo parcialmente si se incuba en presencia de NADPH.

#### 4. REACTIVACION POR FERRICIANURO DE DISTINTAS PREPARACIONES INACTIVADAS POR NADH.

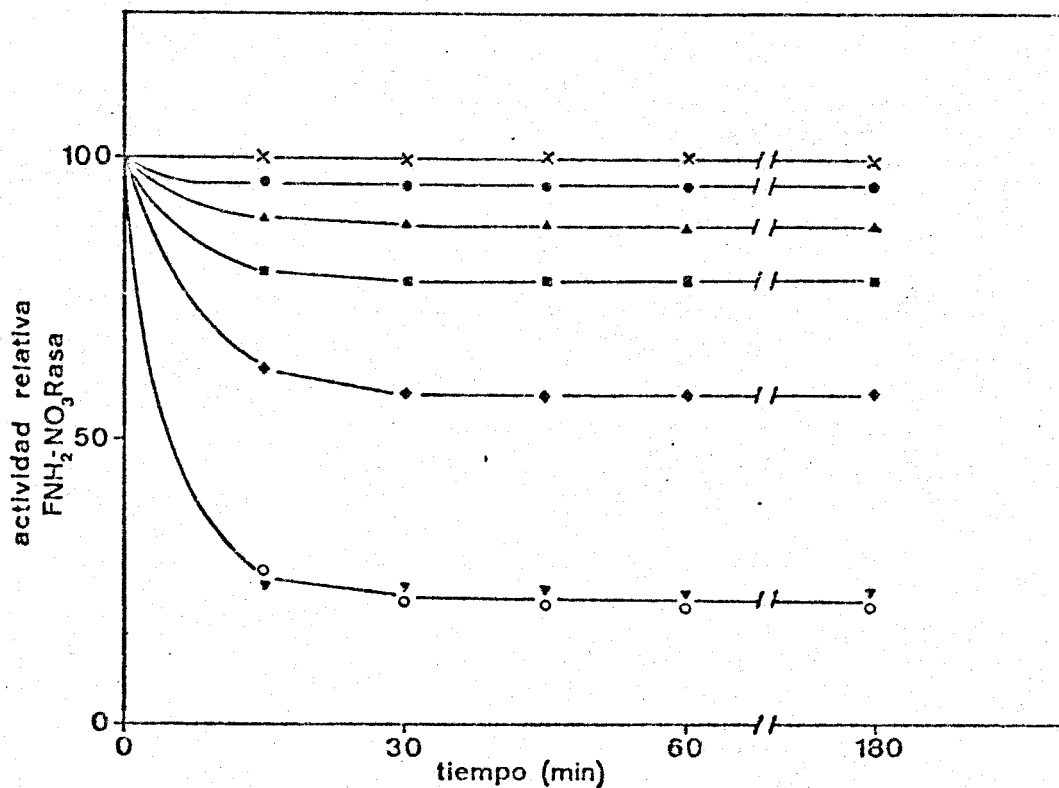


Fig. 8. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NADPH SOBRE UNA PREPARACION DE NITRATO REDUCTASA TRATADA CON p-HMB. La nitrato reductasa (5 mg de proteína/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB (15 nmoles/mg de proteína). A continuación la preparación se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM, para eliminar el exceso de reactivo. La preparación filtrada se incubó a 30°C durante 180 minutos en presencia de NADPH a las siguientes concentraciones: ninguna (x), 0,3 mM (●), 1 mM (▲), 1,5 mM (■), 2 mM (◆), 5 mM (▼), y NADH 0,3 mM (O). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas en las que se determinó la actividad FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa.

(\* Preparación II

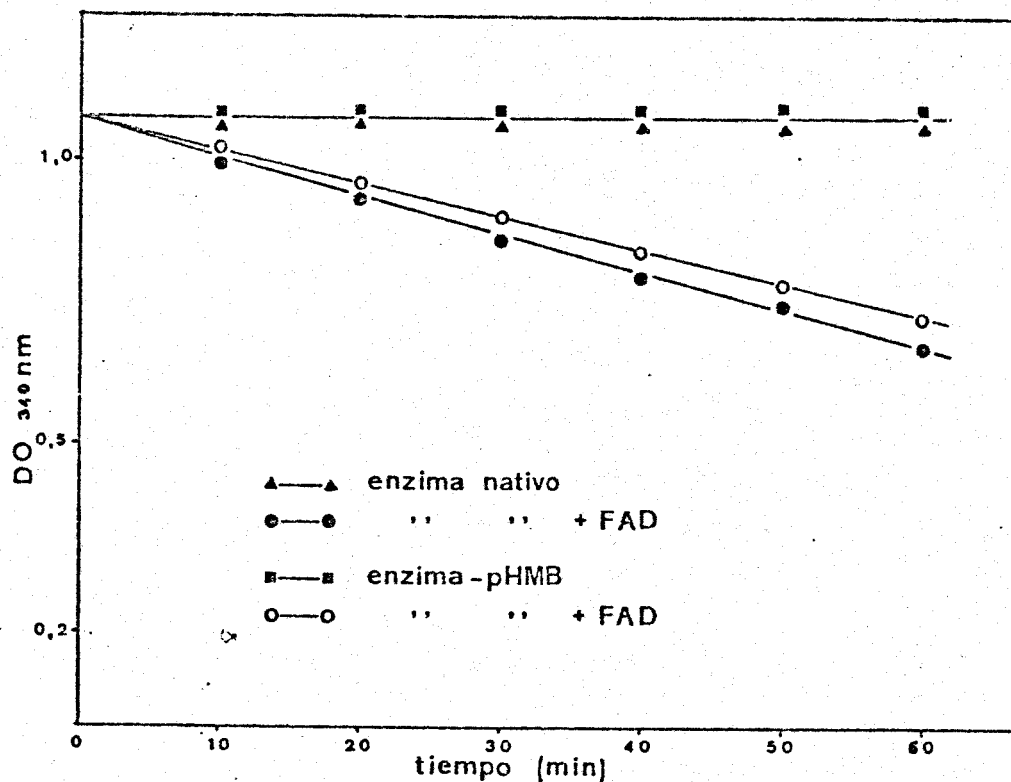


Fig. 9. ACTIVIDAD NADPH-OXIDASA DE UNA PREPARACION NATIVA Y UNA PREPARACION TRATADA CON p-HMB. La preparación enzimática\* nativa (4 mg de proteína/ml) y la preparación tratada con p-HMB (4 mg de proteína/ml) se incubaron a 30°C durante 1 hora en presencia de fosfato 0,1 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM, NADPH 0,1 mM y, en su caso, en presencia de FAD 0,02 mM. La actividad NADPH-oxidasa se determinó midiendo la disminución de la densidad óptica a 340 nm en un espectrofotómetro dotado de un dispositivo automático de cambio de cubetas y lectura de las mismas a intervalos regulares de tiempo.

La concentración de p-HMB utilizada fue de 20 nmoles por mg de proteína.

(\* ) Preparación II

La reactivación por ferricianuro del enzima inactivado por NADH tiene lugar independientemente de la actividad diaforasa. En la Tabla XVII puede observarse la reactivación por ferricianuro de tres preparaciones de nitrato reductasa: una preparación nativa, una preparación tratada con p-HMB y otra preparación calentada en presencia de FAD. Como puede verse en la tabla, la reactivación por ferricianuro es idéntica en las tres preparaciones a pesar de que la preparación tratada con p-HMB carece de actividad diaforasa.

## 5. EFECTO DEL FAD SOBRE LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS.

### 5.1. INACTIVACION POR NAD(P)H Y FAD DE UNA PREPARACION NATIVA Y UNA PREPARACION TRATADA CON p-HMB.

La nitrato reductasa nativa se inactiva por NADH o NADPH tanto en presencia como en ausencia de FAD. Sin embargo, una preparación tratada con p-HMB sólo se inactivaba por NADH en presencia de cantidades catalíticas de FAD. Como se ve en la Tabla XVIII, la preparación tratada con p-HMB se inactivaba por NADH y FAD, mientras que la inactivación de esta preparación por NADPH no tuvo lugar ni si-

TABLA XVII

REACTIVACION POR FERRICIANURO DE DISTINTAS PREPARACIONES  
INACTIVADAS POR NADH

Preparación	Actividad relativa FNH <sub>2</sub> -NO <sub>3</sub> Rasa	
		Tratado con FeCl (1)
Nativa	10	78
Calentada- FAD	18	80
Tratada con p-HMB	12	75

La preparación calentada (2 mg/ml) se obtuvo incubando el enzima a 45°C durante 5 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM y FAD 0,02 mM.

La preparación tratada con p-HMB se obtuvo incubando el enzima (2 mg de proteína/ml) a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, FAD 0,02 mM y p-HMB (10 nmoles/mg de proteína). A continuación se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM y FAD 0,02 mM, para eliminar el exceso de reactivo.

Las distintas preparaciones se incubaron posteriormente a 30°C durante 60 minutos en presencia de NADH 0,5 mM, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas y se determinaron las actividades FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa que se expresan como porcentajes del control sin adición de NADH.

(1) Las preparaciones inactivadas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos en presencia de ferricianuro 0,3 mM, al cabo de los cuales se determinaron las actividades FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa.

Se utilizó la preparación II.

TABLA XVIII

EFFECTO DEL FAD SOBRE LA INACTIVACION POR NAD(P)H DE UNA  
PREPARACION TRATADA CON P-HMB

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2\text{-NO}_3^{\text{Rasa}}$	
	Preparación tratada con p-HMB	Preparación nativa
Ninguna	100	100
NADH	75	20
NADH, FAD	20	15
NADPH	85	25
NADPH, FAD	85	20

La nitrato reductasa\* (5 mg/ml) se incubó durante 10 minutos a 30°C en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, FAD 0,02 mM y p-HMB (10 nmoles/mg de proteína). A continuación la preparación se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM. La preparación filtrada y una preparación nativa se incubaron a 30°C durante 60 minutos en presencia de NAD(P)H 0,5 mM con y sin FAD 0,02 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\* ) Preparación II

quiera en presencia de flavin nucleótido.

### 5.2. INACTIVACION POR NAD(P)H, CIANURO Y FAD DE UNA PREPARACION TRATADA CON p-HMB.

La Tabla XIX muestra como una preparación de nitrato reductasa tratada con p-HMB sólo se inactiva por NADH y CNK si se añade FAD a la mezcla de incubación. Tampoco en este caso el FAD potenciaba la inactivación por NADPH y CNK del enzima modificado por el tratamiento con p-HMB.

### 5.3. INACTIVACION POR NAD(P)H Y FAD DE UNA PREPARACION DE NITRATO REDUCTASA TRATADA CON p-HMB EN PRESENCIA DE SUSTRATOS PROTECTORES.

Una preparación de nitrato reductasa tratada con p-HMB en presencia de sustratos protectores de la diaforasa como el NADH y el FAD presentaba requerimiento de FAD para la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa por NADH o NADPH. En las Tablas XX y XXI se observa que el FAD potencia la inactivación por NADH o NADPH del enzima modificado por tratamiento con p-HMB en presencia de NADH o FAD, a pesar de que la actividad diaforasa de estas preparaciones es un 60 y un 40 por ciento respectivamente de la actividad diaforasa de una preparación nativa.



TABLA XIX

EFFECTO DEL FAD SOBRE LA INACTIVACION POR NAD(P)H Y CIANURO POTASICO DE UNA PREPARACION TRATADA CON P-HMB

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
Ninguna	100
NADH, CNK	80
NADH, CNK, FAD	25
NADPH, CNK	80
NADPH, CNK, FAD	80

La nitrato reductasa\* (5 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, FAD 0,02 mM y p-HMB (20 nmoles/mg de proteína). A continuación se determinó la actividad diaforasa y se pasó la preparación por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM y se incubó a 30°C durante 15 minutos en presencia de los reactivos indicados en la tabla a las concentraciones siguientes: CNK, 0,01 mM NAD(P)H, 0,1 mM; FAD 0,02 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\*) Preparación II

TABLA XX

INACTIVACION POR NAD(P)H Y FAD DE UNA PREPARACION DE NITRATO  
 REDUCTASA TRATADA CON p-HMB Y NADH

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
Ninguna	100
NADH	50
NADH, FAD	15
NADPH	90
NADPH, FAD	65

La nitrato reductasa\* (5 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM,  $\text{NO}_3\text{K}$  10 mM, FAD 0,02 mM, NADH 0,5 mM y p-HMB (10 nmoles/mg de proteína). A continuación la preparación se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM y se incubó a 30°C durante 60 minutos en presencia de los compuestos indicados en la tabla. La actividad  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa se determinó en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación. Después del tratamiento con p-HMB, la actividad diaforasa era un 60% de la inicial.

(\*) Preparación II

TABLA XXI

INACTIVACION POR NAD(P)H Y FAD DE UNA PREPARACION DE NITRATO  
REDUCTASA TRATADA CON p-HMB Y FAD

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Redu
Ninguna	100
NADH	30
NADH, FAD	7
NADPH	70
NADPH, FAD	45

La nitrato reductasa\* (5 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, FAD 1,5 mM y p-HMB (5 nmoles/mg de proteína). A continuación la preparación se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, y se incubó a 30°C durante 60 minutos en presencia de NADH 0,5 mM, NADPH 0,5 mM y FAD 0,02 mM. La actividad  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa se determinó en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación. Después del tratamiento con p-HMB, la actividad diaforasa era un 40% de la inicial.

(\*) Preparación II

#### 5.4. EFECTO DEL FAD SOBRE LA INACTIVACION POR NADH DE UNA PREPARACION TRATADA CON p-HMB Y DTE.

Si una preparación de nitrato reductasa se trataba con p-HMB y se incubaba posteriormente con un exceso de DTE, podía conseguirse una reactivación parcial de la diaforasa. Si la incubación con DTE se realizaba en presencia de FAD podía conseguirse una reactivación total. Como se muestra en la Tabla XXII, el grado de inactivación por NADH de ambas preparaciones es idéntico y además, ninguna de las dos preparaciones presenta requerimiento de FAD para la inactivación por NADH de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa.

#### 6. INACTIVACION POR NAD(P)H Y FAD DE PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA TRATADAS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE p-HMB.

##### 6.1. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE p-HMB SOBRE LA CAPACIDAD DE INACTIVACION POR NADH.

La capacidad de inactivación por NADH y FAD disminuía si se trataban las preparaciones de nitrato reductasa con p-HMB a concentraciones altas. La Figura 10 muestra como la desaparición de la actividad diaforasa de estas preparaciones no va acompañada de la desaparición de la capacidad de inactivación por NADH y FAD. Sin embargo, si se au-

TABLA XXII

INACTIVACION POR NADH DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DTE

Tratamiento con DTE	Adición	FNH <sub>2</sub> -nitrato reductasa (Actividad relativa)
En ausencia de FAD	Ninguna	100
	NADH	30
	NADH, FAD	25
En presencia de FAD	Ninguna	100
	NADH	25
	NADH, FAD	23

La nitrato reductasa\* (5 mg/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de p-HMB (30 nmoles/mg de proteína). Después de este tratamiento, el enzima se incubó con DTE 1 mM en presencia y ausencia de FAD 0,2 mM. Después de 15 minutos de incubación, las preparaciones se pasaron por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5) y EDTA 1 mM. Las preparaciones eluídas se incubaron durante 1 hora a 30°C en presencia de los compuestos indicados en la tabla a las concentraciones siguientes: NADH, 0,5 mM; FAD, 0,02 mM. Las actividades FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\*) Preparación II

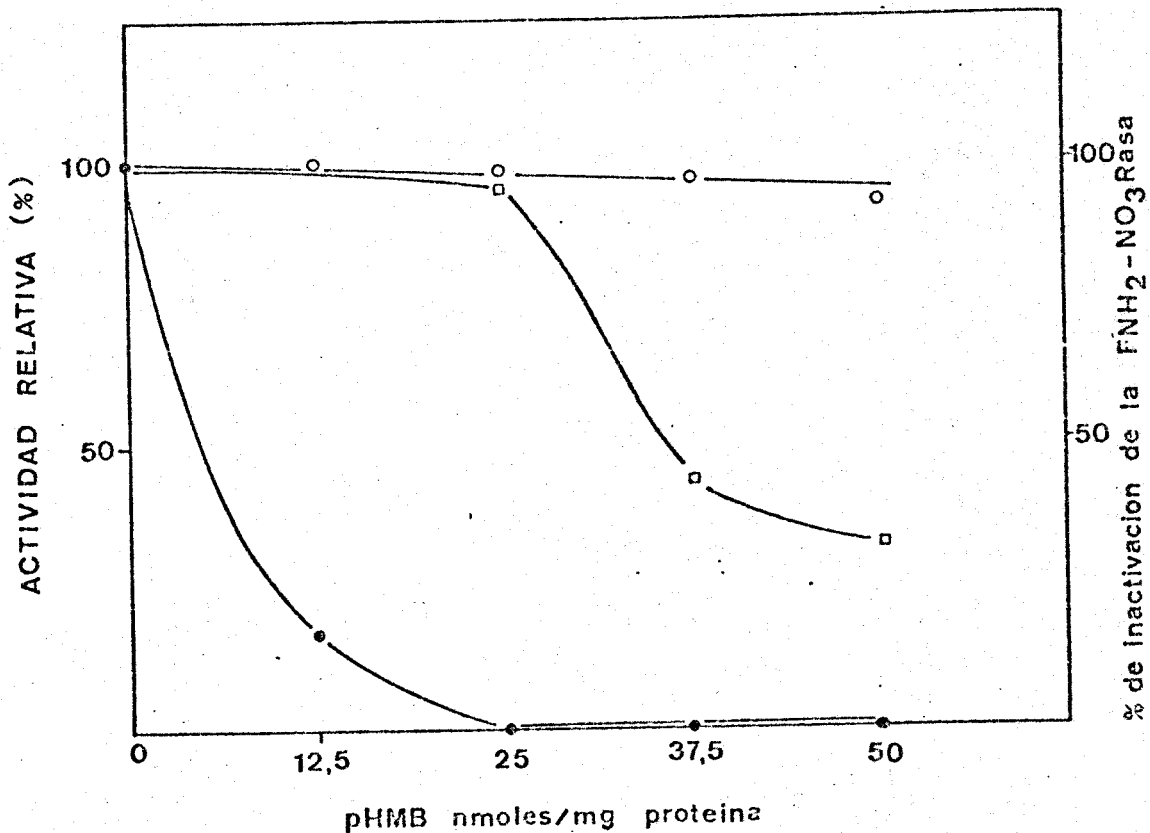


Fig. 10. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE p-HMB SOBRE LAS ACTIVIDADES NADH-DIAFORASA Y FNH<sub>2</sub>-NITRATO REDUCTASA Y SOBRE LA CAPACIDAD DE INACTIVACION POR NADH.

La nitrato reductasa\* (3 mg de proteína/ml) se incubó a 30°C durante 10 minutos en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB a las concentraciones indicadas. Las preparaciones se pasaron por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM y EDTA 1 mM. A cada preparación se le determinó la actividad NADH-diaforasa (●) y FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa (O) y a continuación se incubaron a 30°C durante 60 minutos en presencia de NADH 0,5 mM, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas de las mezclas de incubación y se determinaron las actividades FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa. La capacidad de inactivación (□)<sup>2</sup> se expresa como el % de inactivación de la FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa producida por el NADH.

(\*). Preparación II

mentaba suficientemente la concentración de p-HMB, se obtenían preparaciones cuya capacidad de inactivación por NADH y FAD disminuía significativamente. Asimismo, el requerimiento de FAD para la inactivación por NADH aumentaba a medida que se incrementaba la concentración del reactivo, tal como se observa en las Figuras 11 y 13. Es interesante destacar que la actividad diaforasa de las preparaciones tratadas con el mercurial no se incrementaba en presencia de FAD, mientras que la capacidad de inactivación por NADH sí se potenciaba por el FAD.

#### 6.2. EFECTO DE LA CONCENTRACION DE p-HMB SOBRE LA CAPACIDAD DE INACTIVACION POR NADPH.

La capacidad de inactivación por NADPH y FAD de las preparaciones tratadas con p-HMB se afectaba según la concentración de reactivo utilizada. La Figura 12 muestra como disminuye la capacidad de inactivación por NADPH y FAD a medida que se aumenta la concentración del mercurial.

#### 7. INACTIVACION POR NAD(P)H Y FMN DE UNA PREPARACION DE NITRATO REDUCTASA TRATADA CON p-HMB.

El FMN producía una potenciación de la inactivación por NADH de una preparación tratada con p-HMB. Como se ob-

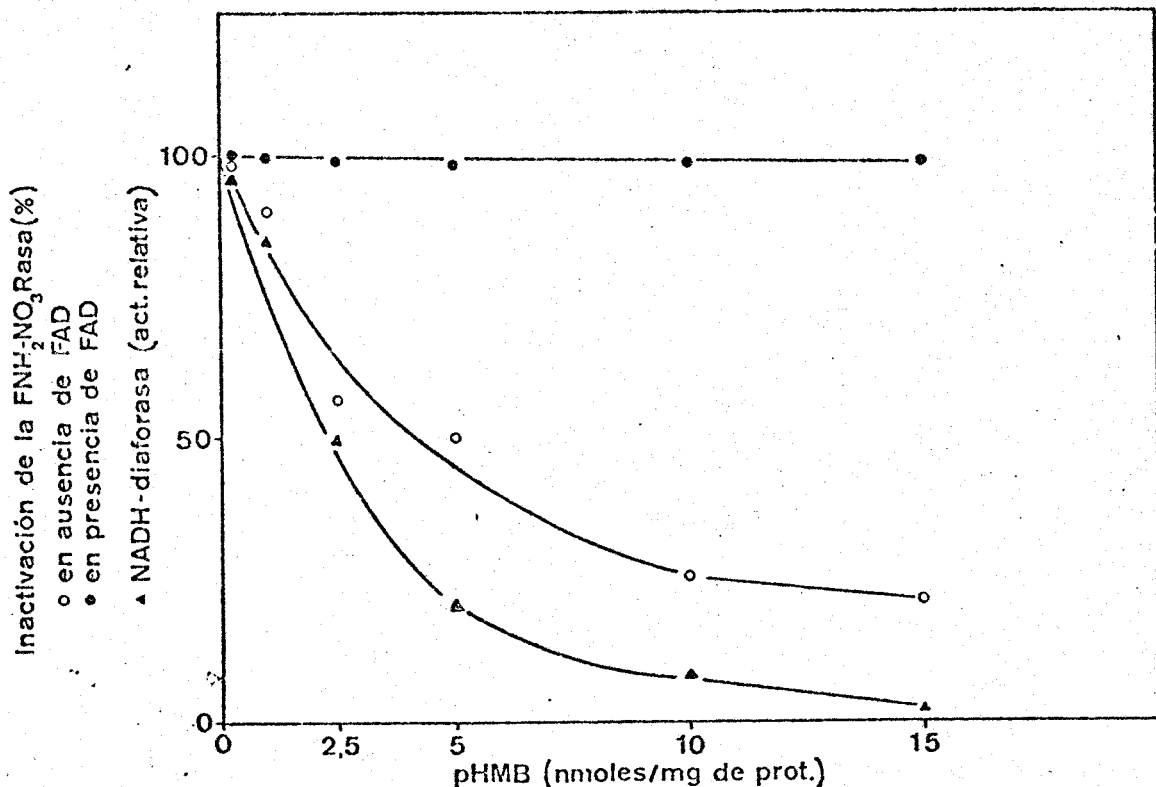


Fig. 11. EFECTO DEL FAD SOBRE LA INACTIVACION POR NADH DE PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA TRATADAS CON P-HMB. La preparación enzimática\* (5 mg/ml) se incubó durante 10 minutos a 30°C en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM, FAD 0,02 mM y p-HMB a las concentraciones indicadas en la figura. Inmediatamente después las preparaciones se pasaron por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5) y EDTA 1 mM para eliminar el exceso de p-HMB y FAD y se incubaron durante 1 hora en presencia de NADH 0,5 mM con (●) y sin (○) FAD 0,02 mM. Al final de la incubación se tomaron alícuotas y se determinaron las actividades FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa. Después de pasadas por las columnas de Sephadex se determinaron las actividades NADH-diaforasa (▲) de las preparaciones; las actividades eran idénticas, ya se determinarían en presencia o ausencia de FAD 0,02 mM.

(\*) Preparación II



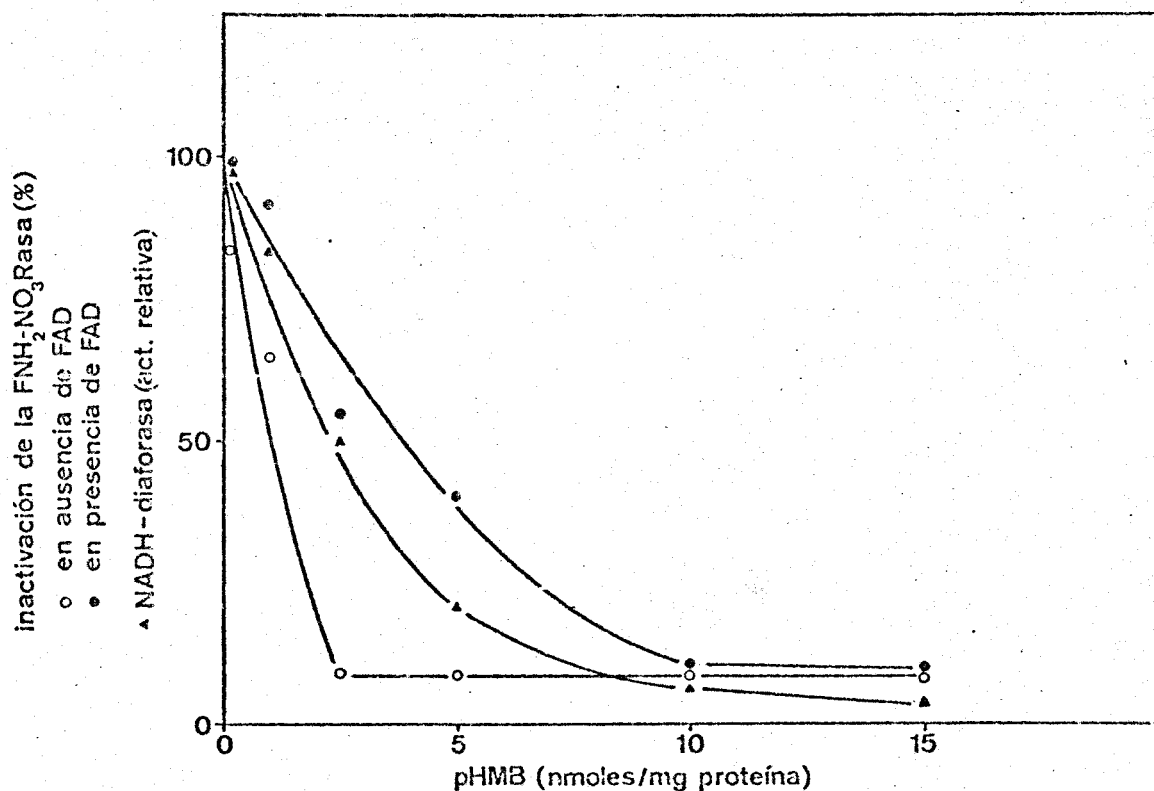


Fig. 12. EFECTO DEL FAD SOBRE LA INACTIVACION POR NADPH DE PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA TRATADAS CON p-HMB. El experimento se llevó a cabo en las mismas condiciones que las descritas en la Figura 11, usando NADPH en lugar de NADH.

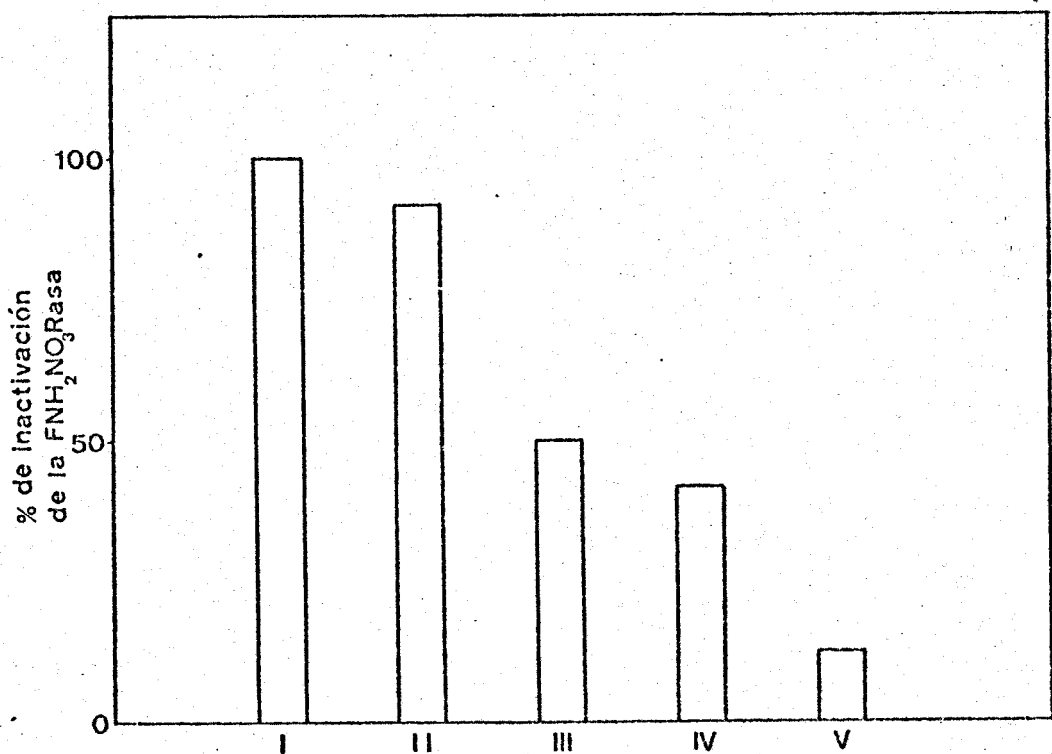


Fig. 13. INACTIVACION POR NADH EN AUSENCIA DE FAD DE PREPARACIONES DE NITRATO REDUCTASA TRATADAS CON p-HMB. La preparación enzimática nativa (I) y las preparaciones tratadas con concentraciones crecientes de p-HMB (II, 1nmol de p-HMB/mg de proteína; III, 2,5 nmoles/mg; IV, 5 nmoles/mg; V, 25 nmoles/mg) se pasaron por columnas de Sephadex G-25 equilibradas en fosfato 0,1 M (pH 7,5) y EDTA 1 mM y se incubaron a 30°C durante 1 hora en presencia de NADH 0,5 mM. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

serva en la Tabla XXIII, la inactivación por NADH es mayor si se añade FMN a la mezcla de incubación. No obstante, el incremento de inactivación producido por el FMN es menor que el producido por el FAD.

El FMN no parece afectar a la inactivación por NADPH de la preparación modificada por tratamiento con p-HMB.

## DISCUSSION

TABLA XXIII

INACTIVACION POR NAD(P)H Y FMN DE UNA PREPARACION TRATADA CON  
p-HMB

Adición	Actividad relativa $\text{FNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa
Ninguna	100
NADH	75
NADH, FMN	50
NADPH	80
NADPH, FMN	70

La nitrato reductasa\* (5 mg/ml) fue incubada durante 10 minutos a 30°C en presencia de fosfato 0,1 M (pH 7,5), FAD 0,02 mM, EDTA 1 mM y p-HMB (20 nmoles/mg de proteína). A continuación la preparación se pasó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada en fosfato 0,1 M (pH 7,5), EDTA 1 mM y se incubó durante 60 minutos en presencia de NAD(P)H 0,5 mM y, en su caso, de FMN 0,05 mM.

Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas tomadas de las mezclas de incubación.

(\* ) Preparación II

La asimilación del nitrato es uno de los procesos más cruciales del metabolismo, ya que constituye la vía más importante de incorporación del nitrógeno a los organismos vegetales. Uno de los problemas más interesantes que se han planteado en el estudio del metabolismo del nitrógeno es la regulación del proceso de asimilación del nitrato, en el que, como es sabido, intervienen dos enzimas, nitrato y nitrito reductasa, que actúan secuencialmente reduciendo el nitrato a amonio.

En la actualidad, el problema de la regulación de la asimilación del nitrato se centra en dos aspectos fundamentales: la conexión entre el proceso metabólico reductor del nitrato y la fotosíntesis, y la regulación de la actividad de los dos enzimas que intervienen en la reducción del nitrato a amonio mediante un mecanismo de interconversión.

Existen numerosos casos de enzimas que intervienen en procesos clave del metabolismo, cuya actividad está regulada por interconversión entre dos especies enzimáticas, una activa y otra inactiva. El paso de una a otra especie se realiza mediante un cambio químico en el enzima que se traduce en la formación o rotura de un enlace covalente. En numerosos casos, existen enzimas que catalizan la activación e

inactivación del enzima interconvertible y que actúan de acuerdo con las necesidades metabólicas celulares. La piruvato deshidrogenasa, por ejemplo, es un complejo enzimático que se inactiva por una fosforilación catalizada por una quinasa específica que forma parte del complejo, y se reactiva por una defosforilación catalizada por una fosfatasa también incluida en el complejo (85).

La interconversión metabólica se ha propuesto como mecanismo regulador de la actividad nitrato reductasa en las algas verdes (46,86,87,88,89), levaduras (90,91) y bacterias (92). Según el modelo propuesto, la nitrato reductasa puede existir en dos formas: una oxidada y activa y otra reducida e inactiva. La conversión de la forma activa en inactiva sería llevada a cabo por los piridín nucleótidos reducidos. En la actualidad no se sabe nada acerca del mecanismo fisiológico de reactivación del enzima inactivo, aunque se ha conseguido la reactivación "in vitro" mediante diversos oxidantes (46,47).

En cuanto a la nitrato reductasa de plantas superiores, no existen investigaciones previas a este trabajo en las que se haya demostrado la existencia de un mecanismo de interconversión. Dada la importancia que tiene para la agricultura

la asimilación del nitrato por las plantas, el conocimiento de la regulación metabólica de este proceso es un problema que reviste el máximo interés, ya que podrían introducirse nuevas técnicas que mejorasen el rendimiento de los cultivos. Por ejemplo, la obtención de mutantes que careciesen de este mecanismo regulador permitiría dirigir la productividad de los cultivos en el sentido de incrementar la producción de proteínas vegetales.

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio de la inactivación de la nitrato reductasa de espinaca por los piridín nucleótidos reducidos y se ha investigado el papel de la díaforasa en la inactivación del enzima.

La nitrato reductasa de espinaca se inactiva por los piridín nucleótidos reducidos; la inactivación es reversible, ya que la actividad puede recuperarse incubando el enzima inactivo con ferricianuro. La inactivación de la nitrato reductasa por NADH o NADPH parece ser un fenómeno general en plantas superiores ya que recientemente se ha demostrado en el enzima de maíz (51).

Los tioles simples inactivan a la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* y espinaca de una forma reversible (22,93).



Tanto la inactivación por tioles como por los piridín nucleótidos reducidos afecta sólo a la segunda porción del complejo,  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. Sin embargo, estos dos tratamientos difieren en algunos aspectos importantes, como por ejemplo que el nitrato solamente protege a la nitrato reductasa de la inactivación por NADH o NADPH y no frente a la inactivación por tioles.

Existen dos explicaciones posibles del fenómeno de inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa por agentes específicos (NADH y NADPH) o inespecíficos (tioles) : la inactivación de la nitrato reductasa puede deberse a la reducción del grupo prostético (probablemente el molibdeno) o bien a la reducción de algún grupo del apoenzima (probablemente un puente disulfuro).

La inactivación de la nitrato reductasa por los piridín nucleótidos reducidos puede potenciarse mediante diversos tratamientos. El enzima de *Chlorella* se inactiva por NADH y ADP (94) en un grado mucho mayor que por NADH sólo. Por otra parte, el ADP está descrito como inhibidor de la nitrato reductasa de plantas superiores (95,96,97). La intervención del ADP en el proceso de inactivación de la nitrato reductasa explicaría la inactivación "in vivo" por amonio del enzima de *Chlorella* y *Chlamydomonas* (87) ya que el amonio es un de-

sacoplante de la fotosíntesis y causaría un incremento de la relación ADP/ATP y del nivel de poder reductor de la célula.

También el cianuro potencia la inactivación por NADH y NADPH de la nitrato reductasa. El cianuro se ha descrito como inhibidor competitivo del enzima (23), pero recientemente se ha estudiado la inactivación por cianuro en presencia de NADH, encontrándose que la nitrato reductasa de espinaca se inactiva rápidamente por cianuro y NADH a bajas concentraciones. Garret y colaboradores han demostrado que la nitrato reductasa de *Neurospora crassa* se inhibe competitivamente por cianuro, pero que esta inhibición es de carácter no competitivo y se potencia si se preincuba el enzima con NADPH y FAD (53). La inhibición por cianuro de la nitrato reductasa de *Chlorella* no es reversible por diálisis si el enzima se preincuba con NADH (52,98). Todos estos resultados coincidentes inducen a pensar que el cianuro se une con mayor afinidad al metal contenido en la segunda porción del complejo cuando el enzima se encuentra en estado reducido. Ahora bien, esto no quiere decir que necesariamente sea el metal el que se encuentre en estado reducido.

El estudio del mecanismo de inactivación de la nitrato

reductasa plantea otra importante cuestión: ¿Qué papel desempeña la porción diaforásica en la inactivación por NADH o NADPH de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa?. Para abordar este problema hemos empleado técnicas que nos han permitido disponer de preparaciones enzimáticas cuyas actividades se han afectado selectivamente mediante diversos tratamientos, como el calentamiento y los agentes usados en la modificación química de proteínas.

Los resultados obtenidos muestran claramente que la inactivación por NADH o NADPH de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa no tiene lugar si se destruye total o parcialmente la actividad diaforasa por calentamiento. Si el tratamiento térmico se hace en presencia de FAD, que protege a la diaforasa de la desnaturalización, la inactivación por los piridín nucleótidos reducidos de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa tiene lugar en el mismo grado que en una preparación nativa. Estos resultados sugieren, en principio, que para que tenga lugar la inactivación de la nitrato reductasa por NADH o NADPH se requiere la funcionalidad de la porción diaforásica del complejo. Sin embargo, no existe proporcionalidad entre la actividad diaforasa o la NADH-nitrato reductasa de una preparación determinada y la susceptibilidad de esta preparación de ser inactivada por los piridín nucleótidos reducidos.

La capacidad de inactivación de varias preparaciones que difieren en la razón NADH-nitrato reductasa/ $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa es semejante, siempre que dicha razón no sea inferior a 0,4.

Recientemente se ha descrito (99), que la nitrato reductasa de *Chlorella fusca* se inactiva por los reactivos del grupo sulfhidrilo, los cuales tienen un efecto bastante específico sobre la porción diaforásica del complejo. Nuestros resultados demuestran que la nitrato reductasa de espinaca se inactiva por reactivos del grupo sulfhidrilo y que las actividades del complejo se afectan de forma diferente por dichos reactivos. En las condiciones experimentales descritas, el yodoacetato, el DTNB y los mercuriales inactivan específicamente a la diaforasa, mientras que la yodoacetamida y la NEM también inactivan a la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. Así pues, los reactivos citados en primer lugar nos han servido de instrumento para disponer de preparaciones enzimáticas modificadas químicamente, pero que conservan la segunda porción prácticamente intacta, al menos en lo que se refiere a la actividad enzimática.

La inactivación de la nitrato reductasa por los mercuriales es reversible, ya que la actividad puede recuperarse mediante un tratamiento con exceso de tiol. La reactivación de

la diaforasa por el DTE requiere la presencia de FAD, lo que sugiere que el mercurial actúa sobre la porción diaforásica desplazando moléculas de FAD absolutamente necesarias para la actividad. Como apoyo de esta hipótesis, hacemos notar que el FAD protege a la nitrato reductasa de espinaca de la inactivación por p-HMB y p-HMBS. Por otra parte se ha descrito que el tratamiento de la sulfito reductasa de E. coli, un enzima estructuralmente muy parecido a la nitrato reductasa, con el mercurial p-HMBS produce una liberación de la flavina contenida en la porción diaforásica del enzima (100).

Los mercuriales inactivan también a la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa, pero la concentración requerida para que esta inactivación tenga lugar es 5-10 veces mayor que la requerida para inactivar a la diaforasa. La actividad  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa se recupera parcialmente incubando el enzima inactivo con DTE y no existe requerimiento de FAD para la reactivación.

El NADH y el FAD protegen a la diaforasa de la inactivación por NEM, yodoacetato y mercuriales. Este efecto protector puede deberse al papel estructural del FAD en la porción diaforásica; en cuanto al NADH, la protección puede deberse a que dicho sustrato favorezca un tipo de conformación que haga inaccesibles los grupos sulfhidrilo a los reactivos mencionados, o a que los grupos se encuentren en el sitio de unión

del NADH.

El tratamiento con reactivos del grupo sulfhidrilo nos ha permitido comparar la inactivación por NADH o NADPH de la nitrato reductasa de preparaciones nativas y de preparaciones que carecen de actividad diaforasa.

Las preparaciones de nitrato reductasa tratadas con ciertos reactivos del grupo sulfhidrilo se inactivan por NADH y FAD a pesar de carecer de actividad diaforasa. El tratamiento con yodoacetato o DTNB produce una modificación química en el enzima que se traduce en la inactivación de la diaforasa; sin embargo, se puede conseguir una inactivación parcial de la nitrato reductasa por NADH y FAD. El tratamiento con mercuriales nos ha permitido disponer de resultados más claros: tanto el p-HMB como el p-HMBS producen una inactivación completa de la diaforasa, a pesar de los cual la nitrato reductasa modificada se inactiva por NADH y FAD en el mismo grado que una preparación nativa. La inactivación por NADH en ausencia de FAD de la nitrato reductasa modificada no es completa y depende de la concentración de mercurial usada para inactivar a la diaforasa. Si esta concentración es alta, el requerimiento de FAD para la inactivación por NADH de la FNH<sub>2</sub>-nitrato reductasa es absoluto, y este requerimiento disminuye a medida que se disminuye la concentración del

mercurial.

La determinación de la capacidad de inactivación por NADH de varias preparaciones tratadas con concentraciones crecientes de p-HMB nos ha permitido comparar la actividad diaforasa, la capacidad de inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa por NADH y el requerimiento de FAD de dicha inactivación. Nuestros resultados demuestran que la pérdida gradual de la actividad diaforasa no va acompañada de la pérdida de la capacidad de inactivación por NADH. La actividad diaforasa de las preparaciones tratadas con p-HMB no se recupera en presencia de FAD y sin embargo, la inactivación por NADH de dichas preparaciones se potencia si se añade FAD a las mezclas de incubación.

Mediante distintos tratamientos hemos conseguido obtener preparaciones que, a pesar de tener una actividad diaforasa alta, presentan requerimiento de FAD para que la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa se inactive por NADH. Si se incuba la preparación con p-HMB en presencia de FAD o NADH se protege la diaforasa de la inactivación pero no desaparece el requerimiento de FAD para inactivar por NADH a la nitrato reductasa. Sin embargo, si se elimina el p-HMB ligado al enzima mediante un tratamiento con DTE, desaparece el requerimiento de FAD para la inactivación por NADH del enzima. El grado de inactivación

por NADH de una preparación tratada con p-HMB y DTE es el mismo que el de una preparación tratada con p-HMB, DTE y FAD a pesar de que en este caso la diaforasa se reactiva casi totalmente.

Una preparación nativa de nitrato reductasa de espinaca se inactiva por NADH o NADPH sin que sea necesaria la presencia de FAD en la mezcla de incubación. La actividad diaforasa de una preparación nativa no requiere FAD adicional en la mezcla de ensayo, pero si se somete dicha preparación a una cromatografía por filtración en gel de Sefarosa, las fracciones recogidas de la columna poseen una diaforasa muy baja que se reactiva hasta un 300% si se incuban las fracciones en presencia de FAD durante un cierto tiempo, igual que ocurre en el enzima de *Chlorella* (5). Recientes experimentos realizados en nuestro laboratorio y que no figuran en el presente trabajo (80f) demuestran que la preparación filtrada por Sefarosa no presenta sin embargo ningún requerimiento de FAD en cuanto a la inactivación por NADH de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa.

En definitiva, parece claro que el tratamiento con mercuriales produce una modificación química en el enzima que ocasiona la pérdida de la actividad diaforasa y la aparición



de un requerimiento de FAD en la inactivación por NADH de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. Sin embargo, en presencia de FAD no se recupera la actividad diaforasa. Por otra parte, el FAD parece jugar un papel importante en la reactivación de la diaforasa del enzima filtrado por Sefarosa, pero no parece intervenir en la inactivación de esta preparación por NADH. Es decir, existen distintos requerimientos de FAD en la nitrato reductasa: un requerimiento de FAD para la diaforasa y otro diferente para la inactivación por NADH. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la inactivación por NADH de la nitrato reductasa no tiene lugar a través de la vía catalítica.

Los reactivos del grupo sulfhidrilo producen un cambio en el enzima que dificulta su inactivación por NADPH, ya que para que se produzca esta inactivación es necesario incrementar de cinco a diez veces la concentración de NADPH que se utiliza para inactivar una preparación nativa. Por otra parte, la actividad NADPH-oxidasa de la preparación tratada con p-HMB es semejante a la de la preparación nativa, así que hay que excluir la posibilidad de que el tratamiento con el mercurial produzca la liberación de una actividad NADPH-oxidasa que agotara rápidamente el NADPH presente en la mezcla

de incubación.

El tratamiento con mercuriales origina tal vez una disminución de la afinidad entre el NADPH y su sitio de unión al enzima. Esta disminución de la afinidad es tanto mayor cuanto mayor sea la concentración de reactivo. Por otra parte, las preparaciones tratadas con bajas concentraciones de mercurial presentan requerimiento de FAD para la inactivación de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa por NADPH.

Todos estos resultados no están de acuerdo con la inactivación del enzima a través de la vía catalítica y apoyan la hipótesis de que la inactivación de la nitrato reductasa por los piridín nucleótidos reducidos tiene lugar mediante una porción reguladora que tendría un sitio de unión para el NADH y el NADPH diferente del sitio catalítico.

La hipótesis de la inactivación del enzima a través de la vía catalítica tropieza además con una objeción:

si la reducción del molibdeno a través de la vía catalítica es la responsable de la inactivación del enzima, la reactivación tendría lugar rápidamente en presencia de nitrato. Sin embargo, los experimentos hechos en este sentido no han proporcionado hasta el momento resultados satisfactorios.

En virtud de estas consideraciones, se ha propuesto la hipótesis de que los piridín nucleótidos reducidos pueden

unirse a un sitio distinto del sitio catalítico, que podría estar situado en una subunidad diferente de la diaforasa, y la inactivación del enzima tendría lugar mediante el paso de electrones desde este segundo sitio a través del FAD hasta algún grupo existente en la segunda porción, probablemente un puente disulfuro, cuya reducción produciría un cambio de conformación y la inactivación del enzima.

En la actualidad no existen pruebas directas de la hipótesis propuesta, pero en un futuro próximo se podrá estudiar la estructura cuaternaria del enzima y el efecto de los tratamientos físicos y químicos utilizados en los experimentos que figuran en el presente trabajo sobre dicha estructura. Es muy posible que algunos de los reactivos utilizados causen una disociación del complejo en subunidades, proceso que podría estudiarse mediante técnicas analíticas de ultracentrifugación. Estos estudios proporcionarían sin duda la información necesaria para esclarecer definitivamente el mecanismo de inactivación de la nitrato reductasa por los piridín nucleótidos reducidos.

## CONCLUSIONES

1. La nitrato reductasa de espinaca se inactiva "in vitro" por los piridín nucleótidos reducidos. La inactivación afecta a las actividades NADH-nitrato reductasa y  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa pero no a la NADH-diaforasa, de lo que se deduce que el efecto inactivante tiene lugar en la actividad parcial  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa.
2. La nitrato reductasa de espinaca inactivada por NADH o NADPH puede reactivarse con ferricianuro. Al parecer, la inactivación se debe a la reducción de algún grupo del enzima y la reactivación, a la reoxidación de dicho grupo.
3. La interconversión "in vitro" de la nitrato reductasa de espinaca por óxido-reducción del enzima apoya la hipótesis de la existencia de un mecanismo de interconversión metabólica de la nitrato reductasa de plantas superiores.
4. El nitrato protege a la nitrato reductasa de espinaca de la inactivación por los piridín nucleótidos reducidos.
5. El calentamiento a  $45^\circ\text{C}$  de la nitrato reductasa de espinaca en ausencia de FAD destruye la actividad diaforasa y la capacidad de inactivación del enzima por el NADH y el NADPH.

6. A concentraciones relativamente bajas, los mercuriales p-HMB y p-HMBS inactivan a la diaforasa y no afectan a la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa. Otros reactivos del grupo sulfhidrilo, como el yodoacetato y el DTNB también afectan selectivamente a la NADH-diaforasa.
7. El NADH y el FAD, pero no el NADPH y el FMN, protegen a la diaforasa de la inactivación por p-HMB, p-HMBS, yodoacetato y NEM. La protección por NADH sugiere que dichos reactivos pueden actuar a nivel del sitio catalítico del enzima, afectando a grupos sulfhidrilo necesarios para la actividad.
8. La nitrato reductasa de espinaca inactivada por p-HMB se reactiva en presencia de DTE. La reactivación de la diaforasa aumenta si el tratamiento con el tiol se hace en presencia de FAD, mientras que la reactivación por DTE de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa no requiere FAD.
9. La nitrato reductasa de espinaca modificada químicamente por el p-HMB, a pesar de carecer de actividad diaforasa, se inactiva por NADH en el mismo grado que una preparación nativa. Por consiguiente, la inactivación de la nitrato reductasa por NADH no parecer estar relacionada con la funcionalidad de la porción diaforásica del complejo.

10. La inactivación por NADH del enzima modificado por el p-HMB requiere FAD exógeno. Sin embargo, el FAD no produce ningún incremento de la actividad diaforasa del enzima modificado, lo cual parece indicar que existe una cierta independencia entre los dos procesos. Si se utilizan bajas concentraciones de mercurial, la inactivación por NADPH de la nitrato reductasa modificada también se estimula por el FAD.
11. Al eliminar el p-HMB del enzima mediante un tratamiento con exceso de DTE desaparece el requerimiento de FAD exógeno para la inactivación por NADH de la  $\text{FNH}_2$ -nitrato reductasa, lo que indica que este requerimiento es una propiedad del enzima modificado.
12. La nitrato reductasa de espinaca modificada por tratamiento con p-HMB se inactiva por NADPH a una concentración 5-10 veces mayor que la necesaria para inactivar una preparación nativa. Esto puede explicarse suponiendo que el mercurial actúa disminuyendo la afinidad entre el NADPH y su sitio de unión al enzima.
13. El efecto del FAD sobre la inactivación por NADH o NADPH de la nitrato reductasa modificada por el p-HMB parece ser independiente del nivel de actividad diafo-

rasa de la preparación. El tratamiento con p-HMB en presencia de NADH o FAD, que protegen a la diaforasa de la inactivación, no hace desaparecer el requerimiento de FAD exógeno para la inactivación por piridín nucleótidos reducidos del enzima modificado.

14. La inactivación "in vitro" de la nitrato reductasa de espinaca por NADH o NADPH no depende al parecer de la funcionalidad de la porción diaforásica del complejo, lo cual parece indicar que la inactivación del enzima por reducción con NADH o NADPH no tiene lugar a través de la vía catalítica. Las pruebas aportadas en el presente trabajo apoyan la hipótesis de la existencia de un sitio de unión para los piridín nucleótidos reducidos que podría pertenecer a una porción del complejo con función reguladora.



## BIBLIOGRAFIA

1. BEEVERS, L. y HAGEMAN, R.H., Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 495 (1969).
2. PANEQUE, A., DEL CAMPO, F.F. y LOSADA, M., Nature, 198, 90 (1963).
3. LOSADA, M. y PANEQUE, A., Anales de Edafología y Agrobiología, 26, 335 (1967).
4. LOSADA, M., La fotosíntesis del nitrógeno nítrico, Real Academia de Ciencias, Madrid. (1972).
5. APARICIO, P.J., Mecanismo molecular de la reducción del nitrato a nitrito en plantas. Anales de la Universidad Hispalense, serie Ciencias, nº 13 (1971).
6. DE LA ROSA, F.F., CASTILLO, F., MENDEZ, J.M. y PALACIAN, E., VI Congreso SEB, Sevilla, 1975, resúmenes, pg. 109.
7. ANACKER, W.F., y STOY, V., Biochem. Z., 330, 141 (1958).
8. EVANS, H.J., y NASON, A., Plant. Physiol., 28, 233 (1953).
9. RAMIREZ, J.M., DEL CAMPO, F.F., PANEQUE, A. y LOSADA, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 15, 297 (1964).
10. DEL CAMPO, F.F., PANEQUE, A., RAMIREZ, J.M. y LOSADA, M. Nature, 205, 387 (1965).
11. LOSADA, M., RAMIREZ, J.M., PANEQUE, A. y DEL CAMPO, F.F., Biochim. Biophys. Acta, 109, 86 (1965).
12. PANEQUE, A., DEL CAMPO, F.F., RAMIREZ, J.M. y LOSADA, M., Biochim. Biophys. Acta, 109, 79 (1965).

13. SCHRADER, L.E., RITENOUR, G.L., EILRICH, G.L. y HAGEMAN, R.H., *Plant Physiol.*, 43, 930 (1968).
14. HAGEMAN, R.H. y HUCKLESBY, D.P., *Meth. in Enzymol.*, 23, 491 (1971).
15. HEWITT, E.J., "Nitrogen nutrition of the plants", editado por E.A. Kirby, University of Leeds, 1970, pg 78.
16. PANEQUE, A. y LOSADA, M., *Biochim. Biophys. Acta*, 128, 202 (1966).
17. PANEQUE, A., APARICIO, P.J., CATALINA, L. y LOSADA, M., *Biochim. Biophys. Acta*, 162, 149 (1968).
18. LOSADA, M., APARICIO, P.J. y PANEQUE, A., *Progress in Photos. Research*, vol.3, ed. Metzner, pg. 1504, Tubingen (1969).
19. ZUMFT, W.G., PANEQUE, A., APARICIO, P.J. y LOSADA, M., *Febs Letters*, 9, 157 (1970).
20. NICHOLAS, D.J.D. y NASON, A., *J. Biol. Chem.*, 211, 183 (1954).
21. BAREA, J.L., MALDONADO, J.M. y CARDENAS, J., *XI Jornadas Bioq. Latinas*, Salamanca, 1973, resúmenes d 102.
22. PALACIAN, E., DE LA ROSA, F., CASTILLO, F. y GOMEZ-MORENO, C., *Arch. Biochem. Biophys.*, 161, 441 (1974).
23. RELIMPIO, A.M., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M., *Febs Letters*, 17, 226 (1971).
24. CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F. y PALACIAN, E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64, 546 (1975).

25. NASON, A. , BOYER , P.D., LARDY, H. y MYRBACK, K., The Enzymes, Academic Press, New York, vol. 7, pg. 587 (1963).
26. NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J., Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 702 (1971).
27. SPENCER, D. y WOOD, J.G., Aust. J. Biol. Sci., 7, 425 (1954).
28. NICHOLAS, D.J.D. y NASON, A., Plant Physiol., 30, 135 (1955).
29. EVANS, H.J. y HALL, N.S., Science, 112, 922 (1955).
30. NICHOLAS, D.J.D., NASON, A. y McELROY, W.D., J. of Biol. Chem. 207, 341 (1954).
31. NICHOLAS, D.J.D. y NASON, A., J. of Biol. Chem., 207, 353 (1954).
32. NICHOLAS, D.J.D. y NASON, A., Arch. Biochem. Biophys., 51 311 (1954).
33. GUERRERO, M.G. y VEGA, J.M., XIV Reunión Soc. Española de Ciencias Fisiológicas, Sevilla, 1973, resúmenes 3.3.
34. APARICIO, P.J., CARDENAS, J., ZUMFT, W.G., VEGA, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A. y LOSADA, M., Phytochem., 10, 1487 (1971).
35. NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J., Plant and Cell Physiol., 12, 465 (1971).
36. NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J., Biochim. Biophys. Acta, 275, 355 (1972).
37. NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J., Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 702 (1971).

38. NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J., *Febs Letters*, 18, 19 (1971).
39. NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J., *Jour. of the less-common metals*, 36, 437 (1974).
40. NOTTON, B.A., GRAF, L., HEWITT, R.J. y POVEY, R.C., *Biochim. Biophys. Acta*, 364, 45 (1974).
41. AFRIDI, M.M.R.K. y HEWITT, E.J., *J. Exper. Botany*, 15, 251 (1964).
42. AFRIDI, M.M.R.K. y HEWITT, E.J., *J. Exper. Botany*, 16, 628 (1965).
43. CANDELA, M.C., FISHER, E.G. y HEWITT, E.J., *Plant Physiol.* 32, 280 (1957).
44. LOSADA, M., PANEQUE, A., APARICIO, P.J., VEGA, J.M., CARDENAS, J. y HERRERA, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 1009 (1970).
45. HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L. y LOSADA, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 48, 996 (1972).
46. MORENO, C.G., APARICIO, P.J., PALACIAN, E. y LOSADA, M., *Febs Letters*, 26, 11 (1972).
47. JETSCHMANN, C., SOLOMONSON, L.P. y VENNESLAND, B., *Biochim. Biophys. Acta*, 275, 276 (1972).
48. LOSADA, M. y ARNON, D.I., *Metabolic Inhibitors*, vol II, Academic Press, New York, 1963, pg. 559.
49. LOSADA, M., HERRERA, J., MALDONADO, J.M. y PANEQUE, A., *Plant Sci. Letters*, 1, 31 (1973).

50. GOMEZ-MORENO, C., CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F. y PALACIAN, E., XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca, 1973, Resúmenes, d 9
51. WALLACE, W., *Biochim. Biophys. Acta*, 377, 239 (1975).
52. VEGA, J.M., HERRERA, J., RELIMPIO, A.M. y APARICIO, P.J., *Physiol. Veg.* 10, 637 (1972).
53. GARRET, R.H. y GREENBAUM, P., *Biochim. Biophys. Acta*, 302, 24 (1973)
54. MEANS, G.E. y FEENEY, R.E., *Chemical modifications of proteins*, Holden Day Inc., S. Francisco (1971).
55. ROBINSON, J.D., *Nature*, 212, 199 (1966).
56. HEITZ, J.R., ANDERSON, C.D. y ANDERSON, B.M., *Arch. Biochem. Biophys.*, 127, 627 (1968).
57. ROBINSON, G.W., BRADSHAW, R.A., KANARECK, L. y HILL, R.L., *J. Biol. Chem.*, 242, 2709 (1967).
58. O'LEARY, M.H. y WESTHEIMER, F.H., *Biochem.*, 7, 913 (1968).
59. MATHEW, E., MERIWETHER, B.P. y PARK, J.H., *J. Biol. Chem.* 242, 5024 (1967).
60. STEIN, W.D. y BARNARD, E.A., *J. Mol. Biol.*, 1, 350 (1959).
61. TAKAHASHI, K., STEIN, W.H. y MOORE, S., *J. Biol. Chem.*, 242, 4682 (1967).
62. LI, T.K. y VALLEE, B.L., *Biochem.*, 4, 1195 (1965).
63. KASTENSCHMIDT, L.L., KASTENSCHMIDT, J. y HELMSEICH, *Biochem.* 7, 3590 (1968).
64. MADSEN, N.B. y CORI, C.F., *J. Biol. Chem.*, 223, 1055 (1956).

65. CHIGNELL, D.A., GRATZER, W.B. y VALENTINE, R.C., *Biochem.* 7, 1082 (1968).
66. GERHART, J.C. y SCHACHMAN, H.K., *Biochem.*, 4, 1054 (1965).
67. GERHART, J.C. y SCHACHMAN, H.K., *Biochem.*, 7, 538 (1968).
68. GERHART, J.C. y PARDEE, A.B., *J. Biol. Chem.*, 237, 891 (1962).
69. KERESZTES-NAGY, S. y KLOTZ, I.M., *Biochem.*, 4, 919 (1965).
70. PONTREMOLI, S., LUPPIS, B., TRANIELLO, S., RIPPA, M. y HORECKER, B.L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 112, 7 (1965).
71. COLMAN, R.F., *Biochem.*, 8, 888 (1969).
72. ELLMAN, G.L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70 (1959).
73. BUTTERWORTH, P.H.W., BAUM, H. y PORTER, J.W., *Arch. Biochem. Biophys.*, 118, 716 (1967).
74. GURD, F.R.N., *Meth. in Enzymol.*, 11, 532 (1967).
75. MARRIAN, D.H., *J. Chem. Soc. (London)*, 1515 (1949).
76. SMYTH, D.G., NAGAMATSU, A. y FRUTON, J.S., *J. Amer. Chem. Soc.* 82, 4600 (1960).
77. WEBB, J.L., *Enzyme and Metabolic Inhibitors*, vol. 2, Academic Press, New York, pg. 729.
78. BOYER, P.D., *J. Amer. Chem. Soc.*, 76, 4331 (1954).
79. CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F., NOVALES, M.A. y PALACIAN, E., VI Congreso SEB, Sevilla (1975), Resúmenes pg. 109.
80. CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F., CALERO, F. y PALACIAN, E., Nitrate reductase from *Spinacea oleracea*. FAD and the inacti-

vation by NAD(P)H. (en vías de publicación).

81. SNELL, E.D. y SNELL, C.T. Colorimetric methods of analysis. D. Van Nostrand Company, Academic Press, New York (1949) pg. 804

82. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W., Biochem. Z., 310, 384 (1941).

83. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J., J. Biol. Chem., 193, 265 (1951).

84. WOOD, W.A., Meth. in Enzymol., vol. 11, 214.

85. REED, L.J., Structure, function and regulation of the Mammalian PD Complex. Metabolic Interconversion of Enzymes, III Simposio Internacional (1973), Seattle, USA.

86. GOMEZ-MORENO, C., Interconversion entre una forma oxidada y activa de la nitrato reductasa, y otra reducida e inactiva. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla (1973).

87. LOSADA, M., Interconversion of nitrate and nitrite reductase of the assimilatory type. Metabolic Interconversion of Enzymes. III Simposio Internacional, Seattle, USA.

88. RIGANO, C. y VIOLANTE, U., Arch. Mikrobiol., 90, 27 (1973).

89. RIGANO, C., ALLIOTA, G. y VIOLANTE, U., Plant Sci. Letters 2, 277 (1974).

90. PICHINOTY, F. y METENIER, G., Annales de l'Institute Pasteur, 111, 282 (1966).

91. RIVAS, J., GUERRERO, M.G., PANEQUE, A. y LOSADA, M., Plant Sci. Letters, 1, 105 (1973).



92. GUERRERO, M.G., VEGA, J.M., LEADBETTER, E. y LOSADA, M., Arch. Mikrobiol., 91, 287 (1973).
93. MORENO, C.G. y PALACIAN, E., Arch. Biochem. Biophys., 166, 269 (1974).
94. MALDONADO, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A. y LOSADA, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 27 (1973).
95. NELSON, N. y ILAN, I., Plant Cell Physiol., 10, 143 (1969).
96. EAGLESHAM, A.R.J. y HEWITT, E.J., Proc. Biochem. Soc., 122, 18P (1971).
97. EAGLESHAM, A.R.J. y HEWITT, E.J., Febs Letters, 16, 315 (1971).
98. SOLOMONSON, L.P., Biochim. Biophys. Acta, 334, 297 (1974).
99. MORENO, C.G., ROLDAN, J.M. y PALACIAN, E., XII Reunión SEB, Madrid 1974, Resúmenes p. 178.
100. SIEGEL, L.M., DAVIS, P.S. y KAMIN, H., J. Biol. Chem., 249, 1572 (1974).

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE CIENCIAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes  
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de  
D. FRANCISCO CASTILLO RODRIGUEZ  
titulada "~~Niños reductores de espina C6 de~~  
~~diverso tratamiento físico y químico sobre~~  
~~las espondilias catelíneas y la su división por púndin en el~~  
acuerdo otorgarle la calificación de sobresaliente  
"cum laude"

Sevilla, 22 de Diciembre 1975

El Vocal,



El Vocal,



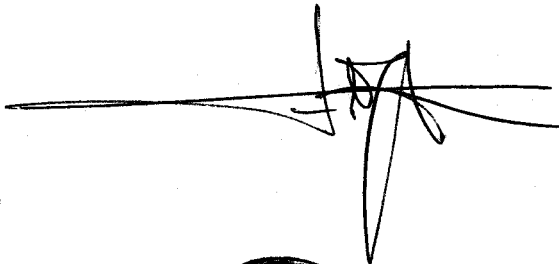
El Vocal,



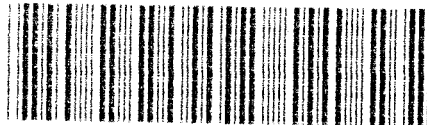
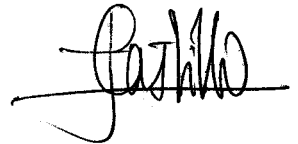
El Presidente,



El Secretario,



El Decano,



500293460

FBI E 70-145

293460