

TD
J27

AI SLAMI ENTO Y CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE MUTANTES DE
Chlamydomonas reinhardi, AFECTADOS EN SU CAPACIDAD
DE ASIMILAR NITRATO

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias
por el Licenciado Francisco M. Sosa Suarez

Sevilla, Noviembre de 1976

Director

Co-director

Ponente

Dr. Jacobo Cárdenas

Dr. Juan López Barea

Prof. Manuel Losada



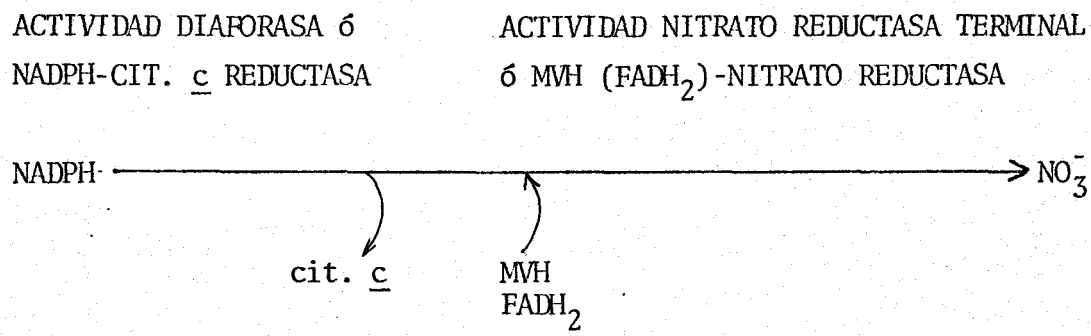
R.18.595

La nitrato reductasa, enzima que cataliza la reducción de nitrato a nitrito, ha sido estudiada en bacterias, algas verde-azuladas, algas verdes, hongos y plantas superiores (1-4). Dicho enzima es un complejo de peso molecular entre 100.000 y 500.000, sometido a regulación en su síntesis y actividad. La nitrato reductasa contiene molibdeno, y la flavina se ha considerado grupo prostético esencial para su actividad (4).

Para estudiar la estructura, secuencia del transporte de electrones y la regulación de este enzima, se han realizado numerosos trabajos bioquímicos consistentes en la purificación y estudio detallado de sus partes, tratamiento con inhibidores específicos, inactivación y reactivación in vivo e in vitro, etc. (4-6). Por otra parte el empleo de mutantes ha sido de gran ayuda para el esclarecimiento de estos problemas. Así, en Escherichia coli se han aislado mutantes deficientes en la nitrato reductasa que han permitido obtener información acerca de la estructura del enzima de esta bacteria (7-18). También se han obtenido mutantes del alga verde-azulada Agmenellum quadruplicatum, por tratamiento con nitrosoguanidina (19). Dos de los mutantes aislados estaban afectados en la nitrato reductasa, y cuatro en la ni

trito reductasa. Uno de estos mutantes carentes de nitrito reductasa ha sido utilizado en el estudio, in situ, de la nitrato reductasa, ya que el nitrito procedente de la reducción de nitrato se excretaba al medio de cultivo y su cuantía daba idea de la actividad de dicha enzima (20). Los mutantes mejor estudiado son los obtenidos en hongos, particularmente en Neurospora crassa y Aspergillus nidulans (21). La nitrato reductasa de ambos organismos se induce por nitrato y se reprime por amonio, y presenta asociadas las actividades que se indican en el siguiente esquema:

ACTIVIDAD NADPH-NITRATO REDUCTASA (TOTAL)



Sorger ha llevado a cabo un estudio genético-bioquímico de mutantes de Neurospora crassa obtenidos anteriormente (22) y de otros aislados por él (23-25), encontrando que existen cuatro genes implicados en la síntesis

de la nitrato reductasa de dicho organismo. A estos genes se les llama nit-1, nit-2, nit-3 y nit-5 (25). Los mutantes afectados en el gen nit-1 conservan la actividad diaforasa, teniendo inactiva la actividad terminal del enzima. El mutante nit-3 posee actividad MVH-nitrato reductasa, pero carece de actividad diaforasa, y los mutantes nit-2 y nit-5 carecen de ambas actividades, aunque parecen poseer una MVH-nitrato reductasa en estado latente (23). El enzima de la estirpe nit-1 parece ser de tamaño notablemente inferior al del tipo silvestre (26).

El estudio de los enzimas de los diversos mutantes y la obtención de una nitrato reductasa activa por complementación entre extractos de nit-1 y de los otros mutantes de Neurospora (27) han permitido sugerir que la nitrato reductasa de este hongo es un agregado constituido, al menos, por una proteína, inducible por nitrato, de peso molecular 100.000 responsable de la actividad diaforasa y un molibdo componente, constitutivo, de pequeño peso molecular (10.000) el cual, asociado a la proteína, sería responsable de la actividad terminal y total de la nitrato reductasa (28).

En Aspergillus nidulans existen al menos cinco genes diferentes, cuya mutación provoca la pérdida simultánea de las actividades nitrato reductasa y xantino deshidrogenasa (29,30). Los mutantes en algunos de estos genes, llamados cnx, conservan una proteína, con actividad diaforasa, de tamaño inferior al enzima nativo del tipo silvestre (31). En dicho organismo existen ciertos mutantes, nia D, sin actividad diaforasa y con actividad nitrato reductasa terminal, mientras otros han perdido todas las actividades del complejo enzimático reductor de nitrato (31). Tras el estudio de estos mutantes, se piensa que la nitrato reductasa de Aspergillus es un agregado formado por dos subunidades protéicas de 4,5 S, codificadas por el gen nia D, y un cofactor de bajo peso molecular en cuya construcción intervendría mediatamente los genes cnx (29-34).

Hasta el presente, no se conocía ningún mutante relacionado con el sistema reductor de nitrato en algas verdes y plantas superiores. En este trabajo se presenta la obtención y caracterización de mutantes del alga verde Chlamydomonas reinhardi, carentes de crecimiento en nitrato.

La nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardi es

un complejo enzimático que reduce el nitrato a nitrito usando NADH como donador de electrones. Dicho enzima posee dos actividades que actúan secuencialmente y se pueden ensayar por separado. De la primera es responsable una diaforasa que cataliza la transferencia de electrones desde el NADH hasta varios aceptores de electrones como citocromo c, DPIP, ferricianuro, etc. La segunda (actividad terminal) reduce al nitrato utilizando los electrones suministrados por el NADH a través de la diaforasa o, directamente, por algunos compuestos reducidos químicamente con ditionito (FMNH_2 , MVH, etc.). El complejo, de alto peso molecular (500.000), es una flavoproteína que contiene molibdeno (35-37).

El NADH ha sido descrito como el donador fisiológico primario y casi exclusivo para la reducción enzimática de nitrato, en la mayoría de las algas verdes y plantas superiores (1-4). Se le había prestado poca atención al NADPH, probablemente por considerársele el donador de electrones peculiar de la nitrato reductasa de hongos (2,4). En células de Chlorella fusca y Ankistrodesmus braunii cultivadas en deficiencias de nitrógeno, se ha encontrado recientemente una nitrato reduc-

tasa que usa NADH y NADPH (38,39). Resultados similares se han comunicado para la nitrato reductasa del alga termoacidófila Cyanidium caldarium (40), y para el enzima de la levadura Rhodotorula glutinis (41). En hojas de soja y plántulas de arroz se han podido aislar dos nitrato reductasas, una de ellas utiliza NAD(P)H mientras otra usa exclusivamente NADH (42-44).

La nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardi se ha descrito como un enzima dependiente de NADH (45). En el presente trabajo se describe la caracterización de la nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardi, 6145 c que usa NADH ó NADPH como donador de electrones, así como de la diaforasa de un mutante (obtenido a partir de esa estirpe) carente de actividad nitrato reductasa, que utiliza también ambos donadores.

En 1964 los estudios llevados a cabo con mutantes de Aspergillus nidulans, sugirieron la presencia de un componente esencial para la actividad de la nitrato reductasa y xantino deshidrogenasa, que sería común para ambos enzimas y diferente de las correspondientes proteínas estructurales (29).

Posteriormente se descubrió que los extractos de diversos organismos como Neurospora (27), Aspergillus (33), numerosas bacterias (46) y varios molibdoenzimas (47,48) contenían un cofactor capaz de restaurar la actividad NADPH-nitrato reductasa del mutante nit-1 de Neurospora. Este cofactor es de naturaleza peptídica (49), con un peso molecular entre 1000 y 10000 (31,49), es sensible al tratamiento térmico a 45°C (50) e insensible a tripsina y proteasa (46,50), y contiene molibdeno (49,51, 52).

En este trabajo se presentan resultados que indican la existencia de un cofactor, en extractos de Chlamydomonas reinhardi, 6145 c cultivada en amonio que restaura la actividad NADPH-nitrato reductasa de los extractos del mutante nit-1.

La nitrato reductasa de Chlamydomonas es un enzima interconvertible que puede existir en una forma reducida, inactiva o en forma oxidada activa (4). La interconversión de la especie activa en la inactiva se ha podido observar in vitro o in vivo, y se ha localizado en la actividad terminal del enzima (45,53).

Actualmente, no esta aclarado el mecanismo por el que los electrones del NAD(P)H inactivan la nitrato reductasa terminal, discutiéndose el posible papel de la actividad diaforasa en el proceso de inactivación. Así, se ha visto, en espinaca, que la destrucción de la actividad diaforasa por tratamiento térmico disminuye grandemente la capacidad de inactivación del enzima por NAD(P)H (54). Sin embargo, la inactivación casi completa de la diaforasa, producida por tratamiento con p-HMB, no impide que el NAD(P)H inactive a la nitrato reductasa terminal en presencia de FAD (55).

En este trabajo se presentan resultados de la inactivación de la nitrato reductasa de un mutante de Chlamydomonas reinhardi carente de actividad diaforása, encontrándose que la mutación ha provocado a la vez la pérdida de la actividad diaforasa y de la capacidad de inactivación in vivo e in vitro de la nitrato reductasa terminal.

1. ORGANISMOS EMPLEADOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

1.1. Cultivo de las células de Chlamydomonas

1.1.1. *Condiciones de cultivo standard*

Las células de Chlamydomonas reinhardi, estirpe 21 gr, y 6145 c cedidas por la Dra Sager (Hunter College, New York) se cultivaron a 23°C con iluminación continua de 3000 lux, suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca.

El medio de cultivo fué el mismo descrito por Sueoka (56) y contenía por litro: ClNH_4 , 0,5 g; PO_4HK_2 , 1,44 g; $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, 0,72 g; $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g; $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g; solución trazas de Hutner, 1 ml. Cuando se usaron NO_3K (0,4 g), ó NO_2K (0,17 g) como fuente de nitrógeno, se añadió para compensar el Cl^- , 0,2 de ClK . La solución trazas de Hutner (57) contenía por litro: BO_4H_3 , 11,4 g; $\text{Cl}_2\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 5,1 g; $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5 g; $\text{Cl}_2\text{Co}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,6 g; $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,6 g; $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,1 g. El medio sólido contenía además agar al 1,75 por ciento.

En los experimentos de caracterización de mutantes, todas las estirpes (incluido el tipo silvestre) se

cultivaron en medios con ClNH_4 10 mM para obtener masa de células. Estas se recogieron, por centrifugación, en fase exponencial de crecimiento y una vez lavadas se pasaron a medios con NO_2K 2 mM, manteniéndose durante seis horas para permitir la desrepresión de la nitrato y nitrito reductasas.

Las algas se cultivaron en tubos de 250 ml por los que se hizo pasar borboteando una corriente de aire enriquecido con un 5% (v/v) de CO_2 que sirvió como fuente de carbono.

Para la caracterización más completa del mutante 104 y estudios de regulación del mutante 305 de Chlamydomonas, éstos y el tipo silvestre se cultivaron en medios con amonio en frascos de Roux de 1 l. La desrepresión de los enzimas se llevó a cabo en medios con NO_3K 4 mM durante 6 horas.

1.1.2. *Condiciones especiales de cultivo*

Cuando se estudió el efecto del hierro en la actividad enzimática del mutante 104, se omitió el metal en la preparación de la solución de trazas, añadiéndose luego las concentraciones de SO_4Fe indicadas. Para minimizar el aporte de hierro por el inóculo, las células utilizadas se cultivaron repetidas veces en medios

carentes del metal.

1.1.3. *Mantenimiento de las estirpes en medio sólido*

Todas las estirpes se sembraron en medio sólido con amonio y se expusieron a la luz durante 3 ó 4 días para permitir un buen crecimiento. Luego, las células se trasladaron a luz difusa, a temperatura ambiente, o bien a la oscuridad, entre 5° y 10°C. El proceso se repitió cada dos meses.

1.2. Cultivo del micelio de *Neurospora*

Los micelios de *Neurospora crassa*, tipo silvestre -988- y estirpe mutante nit-1 -54- (procedentes del Fungal Genetics Stock Center, Arcata, California, U.S.A.) se cultivaron a 25°C en la oscuridad en erlenmeyers de 2 litros, con agitación continua.

El medio de cultivo usado contenía por litro: Sacarosa, 20 g; Tartrato sódico potásico, 2,5 g; PO_4H_2K , 3 g; $SO_4Mg.7H_2O$, 0,5 g; $Cl_2Ca.2H_2O$, 0,13 g; $ClNa$, 0,1 g; Biotina, 5 µg; Solución de trazas de Fries, 1 ml (58). Como fuente de nitrógeno se empleó NO_3K , 5 g; ó $ClNH_4$, 4 g. En el medio sólido se utilizó NO_3NH_4 , 4 g. La solución

de trazas de Fries contenía por litro: $SO_4Zn.7H_2O$, 8,8 g; $Cl_3Fe.6H_2O$, 0,96 g; $Cl_2Cu.2H_2O$, 0,34 g; Tetra borato sódico. $10H_2O$, 0,088 g; $Cl_2Mn.4H_2O$, 0,072 g; $Mo_7O_{24}(NH_4)_4.6H_2O$, 0,064 g. El medio sólido contenía además agar al 1,5% (59).

Para obtener masa de micelio se sembraron esporas en tubos con medio sólido. Al cabo de 3 ó 4 días se suspendieron las esporas producidas en estos tubos en medio líquido esteril, con amonio, se inocularon en 1 litro de este mismo medio y se dejaron crecer durante 48 horas. Para preparar el enzima inducido de la estirpe nit-1, los micelios se recogieron por filtración a través de gasa, se lavaron con agua destilada hasta la eliminación del amonio, se transfirieron a un litro de medio líquido esteril con nitrato y se dejaron con agitación continua, en estas condiciones, durante 3 horas.

2. ENZIMAS

2.1. Obtención de extractos crudos de Chlamydomonas reinhardi

2.1.1. *Recolección de células*

Las células de Chlamydomonas, tipo silvestre y

mutantes, se recogieron, en fase exponencial de crecimiento, por centrifugación a 16.000 x g durante 10 min, se lavaron con tampón Tris 10 mM, pH 7,5, y se sometieron a una nueva centrifugación a 27.000 x g durante 10 min.

2.1.2. *Preparación de extractos acelulares*

Las células recogidas, en las condiciones antes descritas, se trituraron en morteros, alúmina en la proporción de 3 g de alúmina por gramo de peso fresco de células. El material roto se extrajo con tampón Tris-ClH 0,05 M., pH 7,5, en la proporción de 5 ml de tampón por gramo de peso fresco de células. El homogenado obtenido se centrifugó a 27.000 x g durante 15 minutos usándose el sobrenadante como fuente de enzima.

Cuando se partió de una masa grande de células, las células lavadas se mezclaron con tampón Tris-ClH, 0,05 M. pH 7,5, 20 M en FAD, (10 ml de tampón por gramo de profresco) y se rompieron por sonicación a 90 W durante 25 segundos, en porciones de 40 ml. El homogeneado obtenido se centrifugó como en el caso anterior.

En experimentos de complementación in vitro, después de la centrifugación, las células de Chlamydomonas se mezclaron con perlas de vidrio de 0,25-0,30 mm Ø (10 ml de perlas/g de peso fresco de células) hasta formar una pasta homogénea. Esta preparación se sometió a vibración a alta velocidad durante 5 minutos. El homogenado resultante se lavó con tampón fosfato potásico, pH 6,5; 10^{-2} M NO_3Na ; 10^{-4} M MoO_4Na_2 , filtrándose el sobrenadante a través de gasa para retener las perlas de vidrio. Se obtenían así unos 2 ml de extracto por gramo de peso fresco de células. El filtrado se centrifugó a 27.000 x g durante 10 minutos, recogiendo el sobrenadante como fuente de enzima. Todas las operaciones anteriormente descritas se realizaron entre 0°C y 4°C.

2.2. Obtención de extractos crudos de Neurospora crassa

2.2.1. *Recolección de micelio*

Para obtener los extractos acelulares de Neurospora (tipo silvestre y nit-1) el micelio se recogió por filtración a través de gasa y se lavó varias veces con agua destilada. El rendimiento obtenido fué de 5-10 g de micelio por litro de medio de cultivo.

2.2.2. *Preparación de extractos acelulares*

El micelio se trituró en un mortero con alúmina en la proporción de 3 g de alúmina por g de micelio. La pasta obtenida se suspendió en tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7; 5 mM en EDTA; 1% de ClNa (5 ml/g de micelio) y se mantuvo 30 minutos a 0°C. Después se centrifugó a 27.000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante se usó como fuente de enzima.

2.3. Purificación de enzimas

2.3.1. *Purificación de la nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas*

a) Precipitación con sulfato de estreptomicina. Al extracto crudo obtenido según se indicó en 2.1.2. se le añadió, gota a gota y con agitación continua, sulfato de estreptomicina (73 mg/ml, pH 7) en la proporción de 1 ml por cada 10 ml de extracto. Tras 10 minutos a 0°C, con agitación intermitente, se centrifugó a 27.000 x g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante (fracción I). Esta preparación se utilizó preferentemente en la caracterización de las actividades enzimáticas de los mutantes.

b) Precipitación con sulfato amónico.

El sobrenadante anterior se precipitó con sulfato amónico hasta el 45% de saturación. Después de mantener la mezcla durante 15 minutos a 0°C, con agitación intermitente, se centrifugó a 27.000 x g, 10 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado se redisolvió en el mismo tampón de extracción (un volumen igual a la quinta parte del de la fracción I).

En los experimentos de centrifugación en gradiente de sacarosa, el precipitado se redisolvió en la mínima cantidad de tampón, y el exceso de sulfato amónico se eliminó con una columna de Sephadex G-25 equilibrada con el mismo tampón. El tampón empleado en estos experimentos fué Tris-ClH, 0,05 M, pH 7,5; 10 mM en NO₃K; 1 mM en EDTA; 10 µM en FAD.

c) Adsorción en gel de fosfato cálcico.

A la preparación obtenida por precipitación con sulfato amónico (fracción II) se le añadió lentamente y con agitación suave, una suspensión de gel de fosfato cálcico (10 mg/ml) en la proporción de 3 mg de gel por mg de proteína presente en la preparación enzimática. Después de 10 minutos a 0°C, con agitación intermitente, la mezcla

se centrifugó a 4.000 x g durante 5 minutos. El precipitado obtenido se resuspendió con tampón fosfato potásico 0,2 M, pH 7,5; 1 mM en EDTA (un volumen de tampón igual al de la fracción II).

2.3.2. *Purificación de los enzimas de los mutantes 104 y 305*

Incluyó los mismos pasos que la del tipo silvestre, excepto que la precipitación con sulfato amónico fue hasta el 60% de saturación.

2.4. Determinación de actividades enzimáticas

2.4.1. *Determinación de actividades enzimáticas de Chlamydomonas*

La actividad NAD(P)H-nitrato reductasa se determinó por dos procedimientos. Uno de ellos consistía en seguir espectrofotométricamente (a 340 nm) la desaparición de piridín nucleótido reducido, estequiométrica con la reducción de nitrato. La mezcla de reacción contenía, además de la preparación enzimática, 200 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 10 μ moles de NO_3K , y la cantidad de piridín nucleótido reducido indicado en cada caso, en un volumen final de 2 ml. La reacción se empezó añadiendo el nitrato.

El otro procedimiento consistió en medir colorimétricamente el nitrito formado por reducción enzimática del nitrato (60). En este caso, la mezcla de reacción contenía, además del en zima, 100 moles de Tris-ClH, pH 7,5; 10 μ moles de NO_3K y 0,3 μ moles de NAD(P)H, en un volumen final de 1 ml. La reacción se realizó a 30°C, terminándose por acidificación de la mezcla. El nitrito aparecido se determinó como se indica en 3.6. (61).

La actividad NAD(P)H-citocromo c reductasa se determinó siguiendo espectrofotométricamente el cambio de color que acompaña a la reducción del citocromo c (62, 63). La mezcla de reacción contenía, además de la preparación enzimática, 200 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 0,12 μ moles de citocromo c y 0,6 μ moles de NADH ó 0,3 μ moles de NADPH, en un volumen final de 2 ml. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente.

La actividad nitrato reductasa terminal se determinó midiendo el nitrito formado a partir del nitrato, en presencia de FMN ó MV químicamente reducidos con hidrosulfito (64). La mezcla de reacción contenía, además del emzima, 100 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 0,2 μ moles de FMN ó 0,15 moles de MV; 4,6 μ moles de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ y 9,2 μ moles de CO_3HNa ,

en un volumen final de 1 ml. La reacción se llevó a cabo a 30°C y se terminó agitando fuertemente la mezcla de reacción hasta oxidar completamente el ditionito. El nitrito formado se determinó como se indica en 3.6. (61).

La actividad MVH-nitrito reductasa se determinó según el método de Ramirez et al. (65). La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 2 ml, además del enzima, 150 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 4 μ moles de NO_2Na ; 1,5 μ moles de MV y 0,3 ml de una solución que contenía 145 μ moles de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ y 300 μ moles de CO_3HNa por ml. La reacción se llevó a cabo a 30°C, y se terminó agitando vigorosamente hasta la oxidación completa del ditionito. El nitrito se determinó como se indica en 3.6. (61) en una alícuota que contenía la centésima parte del nitrito presente en la mezcla de reacción y se calculó la cantidad de nitrito desaparecido empleando como referencia otra mezcla idéntica en la que se omitió el enzima.

2.4.2. *Determinación de actividades enzimáticas de Neurospora*

La actividad NADPH-nitrato reductasa se estimó en una mezcla de ensayo de 1 ml que, además de la preparación enzimática, contenía 100 μ moles de tampón fosfato potásico, pH 7; 10 μ moles de NO_3K ; 0,02 μ moles de FAD y 0,3 μ moles de NADPH.

La reacción se llevó a cabo a 30°C y se terminó por acidificación, determinándose a continuación el nitrito aparecido (66,67).

Para determinar la actividad NADPH-citocromo c reductasa, la mezcla de ensayo incluía, en un volumen final de 2 ml, 200 μ moles de tampón fosfato potásico, pH 7; 0,24 μ moles de citocromo c; 0,6 μ moles de NADPH, además del enzima. La reacción se siguió espectrofotométricamente por incremento de la absorbancia a 550 nm producido por la reducción del citocromo c (66,67).

La actividad MVH-nitrato reductasa se determinó en una mezcla de ensayo de 1 ml de volumen final que contenía, además del enzima, 100 μ moles de tampón fosfato potásico, pH 7; 10 μ moles de NO_3K ; 0,1 μ moles de MV; 4,6 μ moles de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$; y 9,2 μ moles de CO_3HNa . La reacción se llevó a cabo a 30°C y se terminó por agitación vigorosa hasta la oxidación completa del ditionito. Posteriormente se midió el nitrito formado (61).

2.4.3. *Determinación de otras actividades enzimáticas*

La actividad lactato deshidrogenasa se estimó siguiendo espectrofotométricamente la desaparición de

NADH en una cubeta que contenía, en 2 ml de volumen final, 200 μ moles de tampón Trietanolamina, pH 6; 4 μ moles de piruvato; y 0,3 μ moles de NADH, además del enzima.

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de transformar un μ mol de sustrato en un minuto. La actividad específica se expresa en unidades de enzima por miligramo de proteína.

3 TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

3.1. Determinación de coeficientes de sedimentación por centrifugación en gradiente de sacarosa

Los gradientes se prepararon con sacarosa del 5% al 20% (desde el menisco al fondo) disuelta en tampón Tris-ClH 0,05 M, pH 7,5; 10 mM en NO_3K ; 1 mM en EDTA; 10 μ M en FAD, hasta un volumen de 3,3 ml. Se colocaron 0,2 ml de la preparación enzimática correspondiente, en cada uno, y se centrifugaron a 45.000 r.p.m. en un rotor de receptáculos basculantes SW 56 Ti, durante el tiempo que se indica en cada caso. Acabada la centrifugación, se recogieron fracciones de 0,15 ml y se determinaron las actividades enzimáticas correspondientes.

Los coeficientes de sedimentación se calcularon por el método de Martin y Ames (68), usando como marcadores: ovoalbúmina (50 mg/ml) con $S_{20,w} = 3,66S$, y láctico deshidrogenasa (50 U/ml) con $S_{20,w} = 7,45S$, disueltos en el mismo tampón usado para preparar los gradientes.

3.2. Determinación de pesos moleculares por filtración en gel

Los pesos moleculares de la nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi y de la diaforasa del mutante 104, se estimaron por filtración en gel según el método descrito por Andrews (69), utilizando una columna de Agarosa Bio-Gel A-1,5 m (65,5 cm altura x 1,5 cm \emptyset) equilibrada con tampón Tris-ClH 0,1 M, pH 7,5; 1 mM en EDTA; 20 μ M en FAD. Las proteínas marcadoras y los enzimas se eluyeron con el mismo tampón a un flujo de 12 ml/hora. Se recogieron fracciones de 3 ml con un colector automático. Las preparaciones enzimáticas empleadas fueron las correspondientes al eluato del gel de fosfato.

Las proteínas usadas como marcadores fueron: γ -glo bulina humana, fracción II (PM = 160.000); seroalbúmina bovina (PM = 68.000); ovoalbúmina (PM = 43.000); α -quimo tripsinógeno de pancreas bovino (PM = 23.600) y citocromo c de corazón de caballo, tipo III (PM = 12.400). Para determi

nar el volumen de elución de los marcadores, se midió su absorbancia a 280 nm, excepto el citocromo c que se determino a 412 nm. El volumen vacío de la columna se estimó con azul dextrano.

3.3. Obtención y selección de mutantes afectados en el sistema reductor de nitrato

3.3.1. *Condiciones de mutagénesis*

Células de Chlamydomonas reinhardi, estirpes 21 gr y 6145 c, tomadas de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento (10^6 a 10^7 células/ml) se resuspendieron en un volumen adecuado de tampón Tris-maleico 0,2 M, pH 6, hasta alcanzar una concentración de 10^7 células /ml. Posteriormente se añadió nitrosoguanidina hasta obtener una concentración final de 100 μ g/ml (70) y se matuvieron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Tras este tiempo de tratamiento quedaron alrededor de un 10% de células supervivientes. Después se siguieron dos procedimientos distintos para la obtención de mutantes. Uno consistió en sembrar, en placas de Petri conteniendo medio con amonio, alícuotas de la suspensión que contenía la nitrosoguanidina, diluyendo 10^4 veces. En el otro procedimiento, las células tratadas con nitrosoguanidina se centrifugaron y resuspendieron en medio de cultivo. Esta nueva suspensión se distribuyó en varios

tubos con 20 ml de medio de cultivo con ácido aspártico 0,5 mM como fuente de nitrógeno, en los que permanecieron las células durante 24 horas en la luz y con borboteo de aire y CO₂ como se ha descrito anteriormente (1.1.1.). Tras ese periodo de tiempo, se le añadió a cada tubo ClO₃K hasta alcanzar una concentración 100 mM, y en estas condiciones se mantuvieron las células otras 24 horas. Después, se sembraron alícuotas de 0,5 ml en placas de Petri que contenían medio de cultivo con amonio como fuente de nitrógeno.

3.3.2. Selección de los mutantes

Las placas con amonio en las que se habían sembrado las células procedentes de cualquiera de los dos tratamientos anteriores, se mantuvieron a la luz durante 7-10 días hasta que se formaron colonias verdes apreciables. Estas se replicaron con ayuda de mondadientes estériles, en placas con NO₃⁻, NO₂⁻ y NH₄⁺, y se dejaron crecer a la luz. Se seleccionaron como mutantes aquellas estirpes que crecieron bien en amonio, pero no alguna de las otras dos fuentes de nitrógeno.

3.4. Determinaciones espectrofotométricas

Los coeficientes de extinción molar son: para el NADH y NADPH (340 nm) $6,2 \times 10^3$, para el citocromo c reducido (550 nm) 28×10^3 , para el DPIP oxidado (620 nm) 21×10^3 , y para el ferricianuro (420 nm) 10^3 .

Se usaron cubetas de 1 cm de paso de luz, excepto para medir velocidad de desaparición de NAD(P)H, a concentraciones muy bajas (5 M) en cuyo caso se utilizaron cubetas de 4 cm de paso de luz.

Los productos coloreados que se forman al valorar el nitrito o la proteína, se midieron a 540 y 500 nm, respectivamente.

3.5. Medida del crecimiento celular de Chlamydomonas

Se hizo midiendo la turbidez a 660 nm, o por conteo de células al microscopio.

3.6. Determinación de nitrito

El nitrito se determinó por la reacción de diazotación de Griess-Ilosway, según la técnica propuesta por Snell y Snell (61).

3.7 Determinación de proteína

La proteína se determinó por el método de Lowry (71) usando seroalbúmina como standard, o bien por el método de Warburg y Christian (72).

4. REACTIVOS Y APARATOS

4.1. Reactivos empleados

Los siguientes compuestos: NADH, NAD^+ , NADPH, NADP^+ , FAD, FMN, Citocromo c, p-HMB, Tris, fueron adquiridos a SIGMA, San Luis, U.S.A. El MV, la ovoalbúmina, seroalbúmina, -quimotripsinógeno, -globulina y la nitrosoguanidina, procedían de SERVA, Heidelberg, Alemania, y MANN, Nueva York, U.S.A. El resto de los compuestos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron a PHARMACIA, Upsala, Suecia; MERCK, Darmstad, Alemania; RIEDEL, Hannover, Alemania; BDH, Poole, Inglaterra; CARLO ERBA, Milan, Italia. El agua se desionizó mediante un cambiador iónico SETA R-100, serie 2/67, o en un destilador DRA. El CO_2 empleado en el cultivo de las células fué suministrado por COROMINA INDUSTRIAL, Sevilla.

4.2. Aparatos utilizados

Las células se rompieron en un vibrador Buhler, modelo Vi 2, o por sonicación con un sonicador Branson, modelo B-12 de 20 Kciclos/seg.

La centrifugaciones se hicieron en centrifugas refrigeradas Sorwall RC2-B y Beckman J-21-B.

- 27

Los gradientes de sacarosa se prepararon con un mezclador diseñado por Buchler Instruments, y se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckman Spinco, modelo L2-50B.

Las fracciones se recogieron automáticamente empleando un colector de fracciones Ultrorac 7.000, LKB, sacándolas del tubo del gradiente con un Densi-Flow, diseñado por Buchler.

El micelio de Neurospora se cultivó, con agitación, en un incubador New Bruswick, modelo G-25.

Las determinaciones espectrofotométricas se hicieron en modelos Beckman DK2A y PYE-Unicam SP 1.800 con registro automático. Las medidas colorimétricas en la zona visible se hicieron empleando colorímetros Spectronic 20 y 700 de la casa Baush and Lomb.

Las medidas de pH se hicieron en un aparato de escala expandida Metrohm-Herisau, modelo E-512.

1. OBTENCION Y CARACTERIZACION DE MUTANTES DE Chlamydomonas reinhardi AFECTADOS EN EL SISTEMA DE REDUCCION DE NITRATO

Para la obtención de mutantes de Chlamydomonas incapaces de crecer en nitrato, se usaron dos procedimientos. El primero consistió en la consecución de mutantes con nitrosoguanidina y detección de los mismos una vez crecidos en placas de petri con medio sólido con amonio. El otro método incluyó, además, un posterior enriquecimiento del cultivo en células deficientes ya en nitrato reductasa, en las condiciones que se describen a continuación. Por el primer método se obtuvieron los mutantes: 408, 409, 412, 510 y 514, y los restantes se consiguieron con el segundo procedimiento.

1.1. Enriquecimiento del cultivo en células mutantes, deficientes en nitrato reductasa

Para este tratamiento se usó el ClO_3K , que había sido descrito como agente tóxico para bacterias y hongos normales, debido probablemente a su reducción, catalizada por la nitrato reductasa, hasta algún producto venenoso para la célula (45,73,74). Así, los mutantes no serían sensibles al efecto tóxico del derivado del clorato, por carecer de nitrato reductasa activa.

Para comprobar si el efecto del clorato sobre las células normales se debe a la existencia de una nitrato reductasa activa, y no a causas inespecíficas, se diseñó un experimento cuyos resultados aparecen en la Tabla I. El ClO_3K sólo inhibió el crecimiento de las células cultivadas con ácido aspártico como fuente de nitrógeno, sustancia que no reprime la síntesis de la nitrato reductasa en Chlamydomonas. En presencia de amonio, represor nutricional de la nitrato reductasa (75), el ClO_3K no impidió el crecimiento normal de Chlamydomonas. El aspártico se usa como fuente de nitrógeno, en vez de nitrato, para las células potencialmente deficientes en nitrato reductasa.

1.2. Caracterización de mutantes de Chlamydomonas reinhardtii afectados en el sistema reductor de nitrato

Estos mutantes se seleccionaron por su ausencia de crecimiento en nitrato y crecimiento normal en amonio.

En la Tabla II se presentan los resultados de la caracterización de las actividades del sistema reductor de nitrato en los mutantes obtenidos. Se puede observar que la actividad NADH-citocromo c reductasa es menor en todos los mutantes que en el tipo silvestre, con la excepción de la estirpe 514, y presenta valores muy diversos en los dis

tintos mutantes. Adoptando el criterio de considerar deficientes en la actividad diaforasa a aquellas estirpes con menos del 20% de la del tipo silvestre, escogeríamos como tales a los mutantes 103 y 305, y de una forma menos clara al 412. La actividad FMNH₂-nitrato reductasa se ha perdido en todas las estirpes mutantes, excepto en las 305, 510 y 514. Conviene destacar, que esta actividad alcanza en el mutante 305 un valor doble del exhibido por el tipo silvestre. La pérdida de la actividad NADH-nitrato reductasa es general en todas las estirpes mutantes, con la excepción de las 510 y 514, que conservan niveles normales. La actividad MVH-nitrito reductasa se conserva en todos los mutantes analizados, y a veces es muy superior al nivel encontrado para el tipo silvestre. En resumen, hay una mayoría de mutantes que han perdido la actividad FMNH₂-nitrato reductasa, pero conservan niveles más o menos altos de NADH-citocromo c reductasa. Dos de ellos poseen niveles muy bajos de ambas actividades (mutantes 103 y 412), y sólo una estirpe (mutante 305) conserva activa la FMNH₂-nitrato reductasa, habiendo perdido la actividad NADH-citocromo c reductasa. Es interesante destacar el caso de los mutantes 510 y 514 que a pesar de crecer bien en nitrato y nitrito, conservan niveles normales de todas las actividades del sistema reductor de nitrato (Tabla III).

Con objeto de obtener evidencia de si la diaforasa presente en varios mutantes era una parte de la nitrato reductasa del tipo silvestre, se cultivaron los mutantes y el tipo silvestre 6145 c en medios con nitrito o amonio y se compararon las actividades presentes en las células en uno y otro medio. Los resultados de este experimento se muestran en la Fig. 1. Cuando las células se han cultivado en amonio, el nivel de NADH-citocromo c reductasa es muy bajo tanto en el tipo silvestre como en los mutantes 301 y 307, si se compara con el que se obtiene en las células cultivadas en nitrito. Conviene destacar que el mutante 305, considerado como deficiente en la NADH-diaforasa, tiene, cuando se cultiva en nitrito, una actividad prácticamente igual a la encontrada en las células cultivadas en amonio.

1.3. Caracterización de la nitrato reductasa del tipo silvestre y mutantes, en gradientes de sacarosa

Cuando se centrifugaron en gradientes de sacarosa, durante 12 horas, extractos del tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi, 21 gr, aparecieron asociadas en la misma fracción las actividades NADH-citocromo c reductasa, MVH-nitrato reductasa y NADH-nitrato reductasa (no se muestra esta última actividad), calculándose un coeficiente de

sedimentación de 10 S para el complejo enzimático portador de dichas actividades (Fig. 2).

En la Fig. 3 se representa el comportamiento, en gradiente de sacarosa, de la diaforasa de varios mutantes carentes de actividad FMNH₂-nitrato reductasa. Se ha calculado un coeficiente de sedimentación de 3,4 S para el enzima de la estirpe 102 y de 3,55 S para las estirpes 104 y 307. Para el enzima del mutante 305 de Chlamydomonas, carente de actividad diaforasa, se encontró un coeficiente de sedimentación de 8,3 S (Fig. 4). Todos estos valores de coeficientes de sedimentación se calcularon con respecto a la ovoalbúmina (3,66 S) y la láctico deshidrogenasa (7,45 S).

En la Tabla IV se presentan agrupados los valores de coeficientes de sedimentación para los enzimas de varias estirpes mutantes y del tipo silvestre de Chlamydomonas. Es notable, la gran diferencia existente entre los coeficientes de sedimentación de la nitrato reductasa del tipo silvestre (10 S) y de las diaforasas de los mutantes 102, 104 y 307 (3,5 S). Por otra parte existe poca diferencia entre el coeficiente de sedimentación de la nitrato reductasa del tipo silvestre y el del enzima con actividad nitrato reductasa terminal del mutante 305 (8,3 S).

Cuando la nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi (6145 c) se sometió a centrifugación en gradiente de sacarosa, las actividades se distribuyeron a lo largo del gradiente, como se muestra en la Fig. 5. La NADH-citocromo c reductasa apareció separada en dos picos de actividad. El más pesado se encuentra asociado al pico de actividad MVH-nitrato reductasa y también al de NADH-nitrato reductasa (este último no mostrado). El otro, mucho más ligero, presenta más actividad que el primero y coincide con el pico de actividad NADH-citocromo c reductasa de los mutantes carentes de actividad nitrato reductasa terminal. En la parte central de la figura, se presenta el resultado de la centrifugación en gradiente de sacarosa de la nitrato reductasa del tipo silvestre tratada con lipasa (2 mg/10 ml de extracto enzimático) a 0°C, durante 3 horas. Se aprecia la pérdida del pico más pesado de actividad NADH-citocromo c reductasa, así como de la actividad MVH-nitrato reductasa. Sin embargo, el área del pico ligero sufre un aumento de un 20% respecto al del enzima no tratado.

2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PROPIEDADES DE LAS DIAFORASAS DEL MUTANTE 104 Y DEL TIPO SILVESTRE, 6145 c DE Chlamydomonas reinhardi

2.1. Actividades enzimáticas del mutante 104 de Chlamydomonas

En la Tabla V se presentan los valores de actividades enzimáticas del complejo reductor de nitrato del mutante 104 y tipo silvestre de Chlamydomonas. En el mutante han desaparecido las actividades FMNH₂-nitrato reductasa y NADH-nitrato reductasa, conservando, sin embargo, un nivel alto de actividad NADH-diaforasa. Curiosamente, la nitrito reductasa tiene un valor muy superior al del tipo silvestre.

2.2. Donadores de electrones de la diaforasa del mutante 104 y de la nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas

Se han ensayado el NADH y el NADPH como donadores de electrones de la nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas. Los dos piridín nucleótidos reducidos fueron igualmente efectivos como donadores de electrones para la reducción de nitrato a nitrito cuando se emplearon a una concentración de 0,3 mM (Tabla VI).

Resultados similares se obtuvieron con las diaforasas del mutante 104 y tipo silvestre (Tablas VII y VIII). La velocidad de reducción de citocromo c fué muy similar usando NADH o NADPH como donador de electrones en la reacción catalizada por la diaforasa de ambas estirpes.

Si embargo, la afinidad de la nitrato reductasa del tipo silvestre por los dos piridín nucleótidos, fué distinta. En la Fig. 6 se muestra el efecto de la concentración de NADH y NADPH sobre la velocidad de reducción de nitrato, catalizada por la nitrato reductasa. De dicha representación se deducen valores de K_M de 8 μM y 37 μM , para el NADPH y NADH, respectivamente.

En la Fig. 7 se representa el efecto de la concentración de ambos piridín nucleótidos reducidos sobre la reducción de citocromo c, catalizada por la diaforasa del tipo silvestre de Chlamydomonas. Los valores de K_M calculados en este caso fueron 25 μM para el NADPH y 50 μM para el NADH. El mismo tipo de representación se muestra en la Fig. 8 para la reacción catalizada por la diaforasa del mutante 104. En este caso los valores de K_M que se deducen son 30 μM para el NADPH y 61 μM para el NADH. Se observa, de los datos calculados en esta dos figuras, que

también es mayor la afinidad de ambas diaforasas por el NADPH que por el NADH.

En la Tabla IX se resumen los valores de K_M de la nitrato reductasa del tipo silvestre, y la diaforasa del tipo silvestre y mutante 104, para los piridín nucleótidos reducidos. Se aprecia una diferencia entre los valores de K_M para el NAD(P)H en el tipo silvestre, según se ensaye la actividad enzimática como nitrato reductasa ó como diaforasa. Asimismo, es de destacar la estrecha relación entre los valores de K_M de la diaforasa del tipo silvestre y la del mutante, para cada piridín-nucleótido reducido.

2.3. Represión por amonio de la NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas

En la Tabla X se muestra la actividad NAD(P)H-diaforasa de células del tipo silvestre y mutante 104 de Chlamydomonas, cultivados en distintos medios. Cuando las células se cultivaron en amonio, los niveles de NAD(P)H-diaforasa fueron muy bajos en ambas estirpes. Si las células cultivadas en amonio se transfieren a medios con nitrato, la NAD(P)H-diaforasa de las dos estirpes alcanza niveles normales de actividad.

2.4. Aceptores de electrones de la NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 y del tipo silvestre de Chlamydomonas

En las Tablas XI y XII se presentan las velocidades de la reacción catalizada por la NADPH-diaforasa del tipo silvestre y por la del mutante 104, respectivamente, usando distintos aceptores de electrones. Para ambas estirpes, la máxima actividad se obtuvo utilizando ferri - cianuro como aceptor, aunque también fueron muy eficaces el DPIP y la menadiona, El citocromo c, aceptor de electrones específico de la diaforasa de la nitrato reductasa en Chlamydomonas, se comportó de manera muy similar en las dos estirpes. Con los demás aceptores ensayados se obtuvieron valores de actividad parecidos, con ambas diaforasas. Cuando se ensayaron la actividad NADH-diaforasa del tipo silvestre (Tabla XIII) y la NADH-diaforasa del mutante 104 (Tabla XIV) con diversos aceptores de electrones, se obtuvieron análogos resultados.

Se ha estudiado la afinidad que presenta la diaforasa del tipo silvestre y la del mutante 104 de Chlamydomonas hacía los diferentes aceptores de electrones. La Fig. 9 muestra el efecto de la concentración de citocromo c sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del tipo silvestre, deduciéndose valores de K_M para este aceptor de

17 μM cuando se emplea NADH y 15 μM al emplear NADPH como donador de electrones. En las Figs. 10 y 11 se representa el efecto de la concentración de DPIP y ferricianuro, respectivamente, sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del tipo silvestre. Los valores de K_M calculados para el DPIP y ferricianuro fueron de 28 μM y 34 μM , respectivamente. La Fig. 12 muestra el efecto de la concentración del citocromo c sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas. El valor de K_M calculado para el citocromo c fué de 16 μM . Análogamente, se han calculado las K_M para el ferricianuro y DPIP, de la NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 (Figs. 13 y 14), encontrándose valores de 34 μM en el caso del ferricianuro, usando NADH o NADPH, y de 15 o 21 μM según que el donador usado fuera NADH o NADPH.

La Tabla XV presenta, agrupados, los valores de K_M de las NADH-diaforasa y NADPH-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de Chlamydomonas. De la comparación de los valores obtenidos para ambas estirpes, se deduce que son muy similares tanto en el caso de la NADH-diaforasa como en el de la NADPH-diaforasa, para los tres aceptores estudiados. Solo se aprecia alguna diferencia entre las K_M de la NADH-diaforasa, para el DPIP, del tipo

silvestre y mutante 104.

2.5. Efecto del tratamiento térmico y distintos inhibidores sobre las actividades nitrato reductasa y diaforasa del tipo silvestre, y diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas

En la Tabla XVI se muestra el efecto del tratamiento térmico e inhibidores sobre las actividades del complejo nitrato reductasa del tipo silvestre. Tanto el tratamiento térmico a 45°C, durante 5 minutos, como la adición de p-HMB (10 µM) inactivaron marcadamente la NAD(P)H diaforasa, y por consiguiente la NAD(P)H-nitrato reductasa. Sin embargo, la actividad FMNH₂-nitrato reductasa, prácticamente no se afectó. Ni la azida ni el cianuro tuvieron efecto inactivador sobre la NAD(P)H-diaforasa, aunque impidieron la reducción de nitrato por la NAD(P)H-nitrato reductasa, al inactivar la nitrato reductasa terminal.

En el mutante 104, el efecto del tratamiento térmico y la adición de inhibidores sobre las actividades NADH- ó NADPH-diaforasa fué muy similar al encontrado para la diaforasa del tipo silvestre. El calentamiento a 45°C durante 5 min, y el tratamiento con p-HMB inactiva-

ron sensiblemente dichas actividades, siendo afectadas muy poco por la azida o el cianuro (Tabla XVII).

2.6. Efecto protector del FAD frente al tratamiento térmico de la NAD(P)H-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de Chlamydomonas

En la Fig. 15 se representa el efecto de la concentración de FAD frente a la inactivación por calentamiento de la NADH-diaforasa del tipo silvestre, y de la del mutante 104. Para los enzimas de ambas estirpes, el FAD tuvo un claro efecto protector en un rango de concentraciones desde 0,1 M hasta 50 M. A esta última concentración se alcanzó prácticamente la máxima protección, con valores de actividad superiores incluso a los del enzima sin calentar.

El mismo estudio se hizo para la NADPH-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104, obteniéndose resultados similares para ambas estirpes. Igual que en el caso anterior, se observó efecto protector del FAD a concentraciones comprendidas entre 0,1 M y 50 M, alcanzándose a altas concentraciones de flavinas, valores de actividad iguales o superiores a los del enzima sin tratar (Fig. 16).

2.7. Efecto protector de los piridín nucleótidos reducidos frente a la inactivación, por p-HMB, de la NAD(P)H-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de Chlamydomonas

Como queda dicho antes (apartado 2.5.) el p-HMB a bajas concentraciones, es un potente inactivador de la diaforasa de Chlamydomonas reinhardi. Se estudió el efecto de distintas concentraciones de NADPH frente a la inactivación producida por p-HMB sobre la actividad NADPH-diaforasa de las dos estirpes. En ambos casos se observó una protección de la actividad, cuando el NADPH se preincubó con el enzima y el inhibidor, siendo esta protección sensiblemente menor en el enzima del tipo silvestre que en el del mutante 104 (Fig. 17). En esta última estirpe se alcanzó una protección superior a un 60%, mientras que en el tipo silvestre fué sólo de un 30%. La protección se observó desde concentraciones de NADPH 10⁻⁶ M hasta 300⁻⁶ M para la actividad NADPH-diaforasa del tipo silvestre y desde 2⁻⁶ M a 1 mM para la del mutante 104.

En un experimento similar, usando NADH como protector frente a la inactivación por p-HMB, se alcanzó una protección ligeramente superior al 20% en el enzima del tipo silvestre (rango de NADH: 0,2-0,7 mM); siendo el valor en

el mutante del orden del 45% (rango de NADH: 5-1000 M) (Fig. 18). Con la NADH-diaforasa se obtuvieron resultados similares.

Sólo la forma reducida de los piridín-nucleótidos fué capaz de proteger a la NADPH-diaforasa del mutante 104 frente a la inactivación por p-HMB (Tabla XVIII).

2.8 Cinética en estado estacionario de la NAD(P)H-citocromo c reductasa del mutante 104 de Chlamydomonas reinhardi

El estudio de las velocidades iniciales se hizo variando la concentración de uno de los sustratos para diferentes concentraciones fijas del otro. En las Figs. 19 y 20 se representan los inversos de las velocidades frente a los inversos de las concentraciones de citocromo c oxidado, para varias concentraciones de NADH (Fig. 19) o NADPH (Fig. 20) fijas. En las Figs. 21 y 22 se representan los inversos de las velocidades frente a los inversos de las concentraciones de NADH y NADPH, respectivamente, para varias concentraciones fijas de citocromo c oxidado. En todas estas representaciones existen una distribución de rectas paralelas. De acuerdo con Cleland (76-78), una distribución de rectas paralelas, semejantes a las anteriores, indica

la existencia de un mecanismo enzimático de tipo Ping-Pong. La ecuación a la que se ajusta dicho mecanismo, en función de constantes que se pueden determinar es:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot A \cdot B}{K_a \cdot B + K_b \cdot A + A \cdot B}$$

donde v es la velocidad inicial, A y B son las concentraciones de los sustratos y K_a , K_b y V_{\max} son constantes, que se pueden calcular a partir de las representaciones secundarias (Figs. 23, 24 y 25) donde se representan las intersecciones obtenidas en las representaciones anteriores (Figs. 19, 20 y 21-22) frente al inverso de la concentración de sustrato fijo, según las ecuaciones:

$$I_a = \frac{K_a}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{A} + \frac{1}{V_{\max}}$$

$$I_b = \frac{K_b}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{B} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Los valores obtenidos para K_a y K_b en las representaciones anteriores son: en el caso de la NADH-citocromo c reductasa, 30 μ M para K_a (siendo el NADH el sustrato A) y 7 μ M para K_b (con citocromo c oxidado como sustrato B), y

-44

en el de la NADPH-citocromo c reductasa, 9,3 M para K_a (siendo el NADPH el sustrato A) y 6,5 M para K_b (con citocromo c oxidado como sustrato B). Se encontró un mecanismo similar para la diaforasa de la nitrato reductasa del tipo silvestre. En la Tabla XIX se presentan los valores de K_a y K_b (para el NAD(P)H y citocromo c) de la diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de Chlamydomonas. Se puede observar que los valores de las constantes son del mismo orden en ambas estirpes.

2.9. Efecto de la concentración de hierro en el medio de cultivo sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas

Cuando las células del mutante 104 se cultivaron con distintas concentraciones de SO_4Fe , no se observó dependencia alguna entre la concentración de hierro añadido al medio de cultivo y la actividad NAD(P)H-diaforasa de dicha estirpe. Incluso el cultivo que carecía del metal, presentó niveles normales de dicha actividad enzimática (Tabla XX).

2.10. Determinación del peso molecular de la diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas*, por filtración en columna de agarosa

El peso molecular calculado para la diaforasa del mutante 104, a partir de los datos obtenidos por filtración en una columna de agarosa (Fig. 26) fué de 67.000, sensiblemente inferior al del enzima de la estirpe silvestre (500.000, no presentado).

3. DETECCION EN *Chlamydomonas reinhardi* DE UN COFACTOR CONSTITUTIVO CAPAZ DE RESTAURAR LA ACTIVIDAD NADPH-NITRATO REDUCTASA DEL MUTANTE nit-1 DE *Neurospora crassa*

Se investigó en *Chlamydomonas reinhardi*, 6145 c la posible existencia de un componente necesario para la actividad de la nitrato reductasa, que fuese sintetizado en células cultivadas en amonio, condiciones en las que no se detecta actividad nitrato reductasa (75). Para ello, se intentó en primer lugar restaurar la actividad NAD(P)H-nitrato reductasa del mutante 104 de *Chlamydomonas*, mezclando sus extractos acelulares con los de la estirpe 6145 c. En ningún experimento se consiguió complementación, por lo que se empleó el mutante nit-1 de *Neurospora*, cuya actividad NADPH-nitrato reductasa se restaura mezclando

sus extractos con otros obtenidos a partir del tipo silvestre del hongo cultivado en amonio (27).

En la Tabla XXI se presentan los resultados obtenidos al triturar, juntos, el micelio de nit-1 inducido en nitrato y células de Chlamydomonas cultivadas en amonio. Sin existir prácticamente actividad NADPH-nitrato reductasa en los extractos de nit-1 o Chlamydomonas, por separado, se detecta actividad apreciable en el extracto procedente de la mezcla de las dos estirpes. Cuando las mezclas se mantuvieron 14 horas a 0°C, la actividad detectada fué superior en un 30% a la encontrada tras los primeros 30 minutos de preincubación a temperatura ambiente. Cuando se mezclaron volúmenes iguales de extractos de nit-1 y de Chlamydomonas preparados por separados, se detectó asimismo actividad nitrato reductasa ensayada con NADPH o con MVH (Tabla XXII). No se observó, sin embargo, actividad significativa cuando las mezclas ensayadas fueron: extractos de nit-1 inducido, junto con el tampón de extracción de Chlamydomonas, o extracto de Chlamydomonas cultivada en amonio, junto con el tampón de extracción de nit-1.

El extracto obtenido a partir de células de Chlamydomonas cultivadas en amonio perdía, al día siguiente

de extraerse, gran parte de la capacidad de restaurar la actividad nitrato reductasa de nit-1. La congelación a -20°C y la adición de glutathion fueron incapaces de estabilizar dicha capacidad (Tabla XXIII).

La capacidad de complementación del extracto de Chlamydomonas se pierde cuando se calienta a 45°C durante 5 minutos (Tabla XXIV).

En la Fig. 27 se representa la cinética de complementación entre extractos de nit-1 y Chlamydomonas, para la reconstitución de actividad nitrato reductasa. La complementación fué muy efectiva durante los primeros 30 minutos a temperatura ambiente, y no aumentó sensiblemente a partir de los 60 minutos.

4. PARTICIPACION DE LA ACTIVIDAD DIAFORASA EN LA INACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA TERMINAL. ESTUDIOS DE INACTIVACION EN EL MUTANTE 305 DE Chlamydomonas reinhardi, CARENTE DE ACTIVIDAD DIAFORASA

4.1. Actividades enzimáticas del sistema reductor de nitrato del mutante 305 de Chlamydomonas

En la Tabla XXV se presentan los datos de actividades enzimáticas del mutante 305 y del tipo silvestre,

6145 c de Chlamydomonas. Se observó la pérdida de actividad NADH-citocromo c reductasa y por consiguiente la de actividad NADH-nitrato reductasa, en el mutante 305. Los niveles de actividad MVH-nitrito reductasa fueron similares en el mutante y tipo silvestre. Conviene destacar que la actividad FMNH₂-nitrato reductasa del mutante presentó un nivel de actividad superior al del tipo silvestre.

4.2. Efecto de los piridín-nucleótidos reducidos sobre la actividad FMNH₂-nitrato reductasa del tipo silvestre y mutante 305 de Chlamydomonas

Ni el NADH, ni el NADPH en presencia o en ausencia de FAD inactivaron la actividad FMNH₂-nitrato reductasa del mutante 305 carente de actividad diaforasa (Tabla XXVI). Por el contrario, en el tipo silvestre ambos piridín nucleótidos reducidos provocaron una sensible inactivación, que se puede revertir por oxidación con ferricianuro. Esta inactivación fué mucho menor cuando estuvo presente el FAD en la mezcla de preincubación.

En la Fig. 28 se presentan los resultados de la cinética de una posible inactivación del enzima del mutante 305. No se observó inactivación de la actividad FMNH₂-nitrato reductasa por NAD(P)H en todo el tiempo

que duró la preincubación (23 horas). La actividad del tipo silvestre sin embargo, disminuyó sensiblemente, en presencia de NAD(P)H con o sin FAD. Esta inactivación fue relativamente rápida hasta las 8 horas. A partir de punto, en ausencia de FAD, la actividad disminuyó lentamente hasta un nivel algo mas bajo. En las mezclas con NAD(P)H y FAD, la inactivación tuvo lugar de la misma manera hasta las 8 horas, pero después se observó una recuperación de la actividad.

4.3. Inactivación por ditionito de la actividad FMNH₂-nitrato reductasa del tipo silvestre y mutante 305 de Chlamydomonas

Cuando el enzima del mutante 305 se preincubó con S₂O₄⁼ y MV, se observó una marcada inactivación de la actividad FMNH₂-nitrato reductasa. El enzima del tipo silvestre también se inactivó con este tratamiento (Tabla XXVII). Estos enzimas inactivos se reactivaron por oxidación con ferricianuro.

4.4. Efecto de la metilamina o el amonio presentes en el medio de cultivo sobre la actividad FMNH₂-nitrato reductasa del tipo silvestre y mutante 305 de Chlamydomonas

Se estudió la posible inactivación, in vivo, de la nitrato reductasa terminal del mutante 305. La actividad FMNH₂-nitrato reductasa del enzima del tipo silvestre, 6145 c, en el caso de las células sin ningún tratamiento, fué muy inferior al nivel de actividad obtenido cuando se le añadió ferricianuro a ese mismo enzima (Tabla XXVIII). Esto indica que el enzima sale ordinariamente inactivo de las células de dicha estirpe, sin haberlas sometido a tratamiento previo. La adición de metilamina o amonio al medio de cultivo, incrementó el grado de inactivación. Sin embargo, el mutante 305 presentó en todos los casos un nivel de actividad similar, que además no se incrementó por la adición de ferricianuro, lo que parece sugerir que el enzima de este mutante no se inactiva in vivo, por la adición de metilamina o amonio al medio de cultivo.

A la vista de los resultados expuestos, Chlamydomonas reinhardi ha resultado ser un organismo idóneo para obtener mutantes afectados en el sistema reductor de nitrato, confirmándose la capacidad de fácil mutación de este organismo, del que se habían descrito y caracterizado mutantes relacionados con la fotosíntesis (79,80), otros deficientes en componentes de la pared celular (81), o con alteraciones en los flagelos (82).

Además, el empleo del clorato como agente seleccionador de los fenotipos mutantes deficientes en nitrato reductasa, facilitó la detección de estas estirpes, aunque de esta forma se corrió el riesgo de obtener mutantes de características similares. Afortunadamente, el tratamiento con clorato, tras la mutagénesis con nitrosoguanidina, produjo mutantes tan distintos como el 104 o 307, carentes de actividad nitrato reductasa terminal, y el 305 carente de actividad diaforasa.

También se han aislado mutantes, omitiendo el tratamiento de selección por ClO_3K , obteniéndose precisamente en este caso dos estirpes (510 y 514) con características distintas a los demás (Tabla II).

Todos los mutantes obtenidos se pueden clasificar en cuatro grupos distintos (Tabla III). La mayor parte de ellos carecen de actividad terminal, conservando la diaforasa. La alta frecuencia con que se obtienen estos mutantes, se podría deber a que la parte del enzima necesario para la actividad terminal, estuviese codificada por un número de genes superior al de los que intervienen en la síntesis de la diaforasa, lo cual no puede asegurarse con certeza hasta que no se realice un preciso análisis genético. En Aspergillus nidulans parece que existen, al menos, cinco genes que son necesarios para que la nitrato reductasa posea actividad terminal (29,30,34). Podría pensarse que la diaforasa presente en estos mutantes fuera un enzima sin ninguna relación con la nitrato reductasa. Sin embargo, su represión por amonio (Fig. 1) al igual que la de la diaforasa y la nitrato reductasa del tipo silvestre (75), es un argumento bastante fuerte para suponer que la diaforasa de estos mutantes es una parte de la nitrato reductasa.

La gran diferencia entre el coeficiente de sedimentación del enzima del tipo silvestre (10 S), y el de la diaforasa de los mutantes (3,5 S) (Figs. 2 y 3) puede deberse al hecho de que la mutación haya destruido a la

vez la actividad terminal y la capacidad de ensamblaje entre ésta y la diaforasa. Según esta hipótesis se podría considerar a la nitrato reductasa, formada por dos subunidades, una más pequeña responsable de la actividad diaforasa, y otra mayor con la actividad nitrato reductasa terminal (modelo 1 de la Fig. 29). Este modelo no tiene apoyo experimental, ya que no se ha podido, hasta la fecha, separar físicamente la diaforasa de la nitrato reductasa terminal, en el enzima nativo.

La nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardi, 21 gr aparece, en gradiente de sacarosa, en un sólo pico con sus actividades diaforasa y nitrato reductasa terminal, asociadas (Fig. 2). Sin embargo, el enzima del tipo silvestre de esta misma especie pero de la estirpe 6145 c, se comporta de forma distinta, presentando además una actividad diaforasa en un pico más ligero (Fig. 5). Se pueden interpretar este hecho, suponiendo que la nitrato reductasa se disocia en subunidades que siguen teniendo actividad diaforasa. El tratamiento con lipasa aumenta esta disociación espontánea, eliminando toda la actividad diaforasa asociada al complejo enzimático, con lo cual se pierde toda la actividad terminal. Como consecuencia de la disociación se observa un aumen

to en la cantidad de diaforasa en el pico ligero. Al tener la diaforasa de este pico ligero la misma situación en el gradiente que la diaforasa de los mutantes, se podría pensar que la mutación a provocado la disociación del enzima en subunidades. Esto exigiría otro modelo para la nitrato reductasa de Chlamydomonas, según el cual el enzima es un agregado de varias subunidades idénticas, cada una con actividad diaforasa, que necesitan para mostrar actividad total y terminal, la presencia de un cofactor (modelo 2 de la Fig. 29). Este cofactor existe en Chlamydomonas, incluso cuando no se produce la nitrato reductasa, y los resultados relacionados con él se discuten posteriormente con más detalle. Este modelo está de acuerdo con el que se ha postulado para la nitrato reductasa de Neurospora crassa y Aspergillus nidulans (31, 33).

El segundo grupo de mutantes está formado por las estirpes 103 y 412, que han perdido prácticamente todas las actividades relacionadas con la nitrato reductasa. Estos mutantes no han sido estudiados en el presente trabajo.

En el tercer grupo de mutantes solo hay un repre-

sentante (estirpe 305) que se caracteriza por haber perdido la actividad diaforasa, conservando un nivel de nitrato reductasa terminal aún más alto que el tipo silvestre. El enzima de esta estirpe tiene un coeficiente de sedimentación (8,3 S) algo inferior al del tipo silvestre (10 S). Según el primer modelo propuesto para la nitrato reductasa de Chlamydomonas, la mutación habría inactivado la diaforasa, inutilizándola además para unirse a la terminal. Si consideramos el modelo de las subunidades idénticas, tendríamos que suponer una mutación que afecta al sitio de unión de los piridín nucleótidos reducidos, dejando intacto el resto de la proteína. Los mutantes de Aspergillus que poseen sólo la actividad terminal, presentan un coeficiente de sedimentación igual que la nitrato reductasa del tipo silvestre (31), lo cual está más de acuerdo con el segundo modelo propuesto para Chlamydomonas.

Si tenemos en cuenta que el mutante 305 procede de la estirpe silvestre 6145 c, y que la mutación que produce la pérdida de la nitrato reductasa total, ha provocado la desaparición de toda actividad diaforasa, medida con citocromo c (Tabla II), es lógico suponer que en la estirpe silvestre sólo existe una actividad diaforasa apreciable que pertenece a la nitrato reductasa. Estos apoyaría de

nuevo la hipótesis de que la actividad diaforasa del pico ligero se debe a subunidades procedentes de la disociación del complejo nitrato reductasa (Fig. 5). La presencia de subunidades en el enzima de Chlorella, ha sido publicada por Solomonson en un estudio de la nitrato reductasa purificada a homogeneidad (6).

El cuarto grupo de mutantes lo forman dos estirpes que a pesar de no crecer en nitrato, tienen niveles normales en todas las actividades relacionadas con el sistema reductor de nitrato. Probablemente tengan alterado el sistema de transporte del nitrato, por lo que el ión no se puede acumular dentro de las células y ésta no lo puede usar como fuente de nitrógeno.

Se obtuvo evidencia más clara de que la diaforasa de los mutantes carentes de actividad terminal, era parte de la nitrato reductasa, cuando se hizo un estudio paralelo de algunas propiedades del enzima del mutante 104 y de la diaforasa de la nitrato reductasa del tipo silvestre, 6145 c (del cual procedía dicho mutante). Se eligió la estirpe mutante 104 como representante del grupo que tiene sus mismas características, porque presentaba un nivel de diaforasa bastante alto (Tabla V) y era el que crecía

peor en nitrato, haciéndolo perfectamente en amonio. La nitrato reductasa y diaforasa del tipo silvestre, y la diaforasa del mutante 104 son enzimas dependientes de NADH y NADPH, siendo ambos donadores igual de eficientes (Tablas VI-VIII). La actividad NADPH-diaforasa se reprime por amonio, al igual que la NADH-diaforasa (Tabla X), lo que indica su relación con la nitrato reductasa.

Por otra parte, en las dos estirpes el enzima tiene más afinidad por el NADPH (Tabla IX). Este comportamiento con respecto a los piridín nucleótidos reducidos es distinto al de la nitrato reductasa y diaforasa de otra estirpe de Chlamydomonas reinhardi previamente estudiada, algas verdes y plantas superiores, en las que el NADH se considera el donador específico y casi exclusivo de la nitrato reductasa (2,3). En Chlorella y Ankistrodesmus se ha detectado la presencia de una nitrato reductasa que utiliza NADH y NADPH, pero esto ocurría sólo si las células se cultivaban largo tiempo sin fuente de nitrógeno (38,39).

El problema de si hay en la estirpe silvestre 6145 c de Chlamydomonas, una o dos nitrato reductasas

no esta claro todavía, aunque la purificación a que se ha sometido el enzima, y el hecho de que las actividades NADH- y NADPH-nitrato reductasa vayan siempre juntas, hacen altamente improbables la existencia de dos enzimas. En plántulas de arroz (44) y hojas de sojas (42,43), se han detectado dos enzimas distintos, mientras que en la levadura Rhodotorula glutinis (41) solamente existe uno que utiliza ambos piridín nucleótidos reducidos para la reducción de nitrato.

La semejanza encontrada entre las diaforasas del mutante 104 y tipo silvestre, en lo que se refiere a las constantes cinéticas para el NAD(P)H, velocidad de reacción con distintos aceptores, y constantes cinéticas para los mismos, indican no sólo la relación existente entre ambos enzimas, sino también que la diaforasa del mutante 104, a pesar de ser una proteína mucho menor que la nitrato reductasa del tipo silvestre, conserva intactos los sitios de unión para donadores y aceptores, así como la cadena transportadora de electrones para la reducción de los distintos sustratos (Tablas VI-IX, XI-XV, Figs. 6-14).

El efecto específico que tienen algunos tratamien -
tos sobre las distintas actividades de la nitrato reducta

sa, se ha utilizado anteriormente para demostrar la existencia de dos actividades en este sistema: una diaforasa y una nitrato reductasa terminal (45,83). En este trabajo se demuestra que los tratamientos que destruyen la actividad diaforasa en el complejo enzimático de la estirpe silvestre, destruyen igualmente la actividad diaforasa del mutante 104. Así, el calentamiento a 45°C, 5 min y el tratamiento con p-HMB afectan sensiblemente a la actividad diaforasa en ambos casos (Tablas XVI y XVII). De esta forma, la acción inhibidora del calentamiento y el p-HMB sobre las actividades diaforasa y nitrato reductasa, puede localizarse en una proteína de $S_{20,w} = 3,5 S$, con la actividad diaforasa del mutante 104.

Se ha descrito la presencia de FAD en la nitrato reductasa de hongos, algas verdes, y plantas superiores (3, 4). En Chlorella, espinaca (84,85), y más concretamente en Chlamydomonas reinhardi (36) se ha propuesto al FAD como cofactor de la nitrato reductasa, en parte, basándose en el efecto protector que tenía dicho flavín nucleótido frente al tratamiento térmico del enzima, localizándose más concretamente este efecto protector en la actividad diaforasa. En el tipo silvestre 6145 c y mutante 104 de Chlamydomonas, se observa una idéntica protección de la

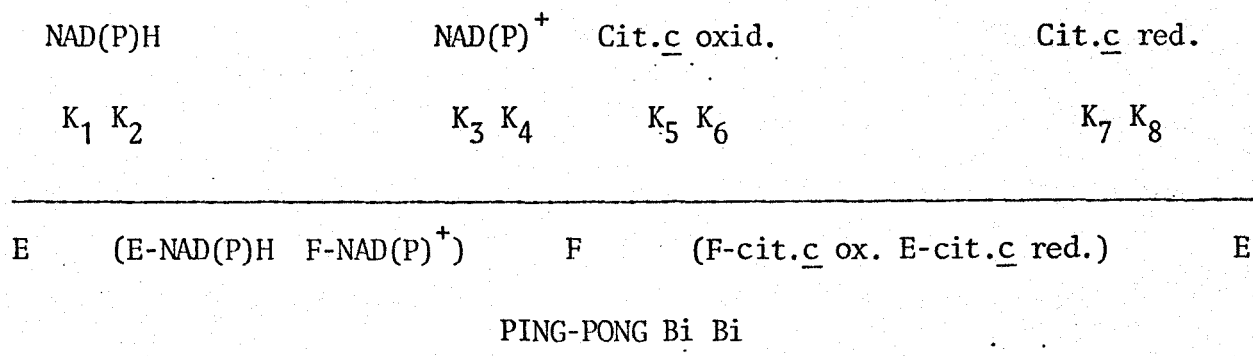
NAD(P)H-diaforasa por concentraciones similares de FAD (Figs. 15 y 16). Esto refuerza el parentesco entre los enzimas de ambas estirpes, y parece indicar que el FAD es un constituyente de la protefina, con actividad diaforasa, del mutante 104.

La actividad NAD(P)H-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 es muy sensible al tratamiento con p-HMB, reactivo característico de grupos -SH (Tablas XVI y XVII). El NADH y aún mejor el NADPH son capaces de proteger al enzima de ambas estirpes de la inactivación que produce dicho reactivo (Figs. 17 y 18). La mayor protección obtenida con NADPH está de acuerdo con la me jor K_M de la diaforasa de ambas estirpes por este piridín nucleótido. Se ha indicado anteriormente, que la protección producida por el piridín nucleótido reducido puede deberse a que el grupo atacado por el p-HMB fuese un grupo sulfhidrilo participante en el mecanismo de la reacción, y localizado en un sitio relacionado con la unión de dicho piridín nucleótido, ya que en de shidrogenasa a las que los piridín nucleótidos reducidos protegen contra la inactivación por reactivos de grupos sulfhidrilo, la afinidad del enzima por el piridín nucleótido disminuye en mayor o menor grado, cuando se tratan

con dichos reactivos (86-89). Algo similar se podría postular para explicar la protección por NAD(P)H, frente al p-HMB, de la diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de Chlamydomonas. Sin embargo, quedaría sin explicar el hecho de que la diaforasa del mutante 104 se proteja más eficazmente por el NAD(P)H, que la del tipo silvestre.

En nitrato reductasa de espinaca, se ha propuesto un mecanismo cinético de tipo Ping-Pong Bi Bi, a partir del estudio de velocidades iniciales de reacción, en estado estacionario (90,91). En Chlamydomonas reinhardi, tipo silvestre y mutante 104, el estudio de las velocidades iniciales en el estado estacionario (steady state) de la NAD(P)H-citocromo c reductasa, dió lugar a una distribución de rectas paralelas en la representación de Lineweaver-Burk (Figs. 19-22).

Estos resultados indican, según Cleland (76-78) que el mecanismo de la reacción catalizada por la diaforasa de ambas estirpes es de tipo Ping-Pong Bi Bi. En este tipo de mecanismo, la reacción transcurre según el siguiente esquema:



Donde E y F son formas distintas del enzima, y K₁, K₂ K₈ son las constantes microscópicas de la reacción. Esto indica que la diaforasa del mutante 104 cataliza la reducción de citocromo c con NAD(P)H, mediante un mecanismo cinético idéntico al de la diaforasa asociada al complejo nitrato reductasa del tipo silvestre, y diferente del mecanismo secuencial ordenado, característico de la mayoría de las deshidrogenasas dependientes de piridín-nucleótidos (92).

Aparentemente, la actividad NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas reinhardi es independiente de la concentración de Fe⁺⁺ añadido al medio de cultivo (Tabla XX), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en otra estirpe de dicho organismo (36).

En resumen, la diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas reinhardi parece ser una subunidad de la nitrato reductasa

y es una proteína de pequeño peso molecular (67.000) que carece de actividad terminal, resultando idónea para el estudio de las propiedades específicas de la diaforasa de la nitrato reductasa. Algunas de estas propiedades se han puesto de manifiesto en este trabajo, y otras serán objeto de posteriores investigaciones.

Se ha publicado la existencia de un cofactor con molibdeno, necesario para la actividad de la nitrato reductasa, presente en varios molibdoenzimas y en células de bacterias y hongos cultivados en condiciones en las que no se sintetiza la nitrato reductasa (21). En Chlamydomonas reinhardi, no se ha podido hasta el momento restaurar la actividad nitrato reductasa del mutante 104, carente de actividad terminal, por adición de extractos del tipo silvestre 6145 c cultivado en amonio. No obstante, se consiguió restaurar la actividad NADPH-nitrato reductasa del mutante nit-1 de Neurospora crassa, carente de actividad terminal (Tablas XXI y XXII), lo que indica que también en algas verdes, concretamente en Chlamydomonas reinhardi, existe un cofactor constitutivo que es capaz de reconstruir la actividad nitrato reductasa perdida en la estirpe nit-1 por una mutación. Probablemente ese cofactor es una parte necesaria para la estructu

tura y actividad de la nitrato reductasa de Chlamydomonas. El hecho de que la diaforasa del mutante 104 no fué capaz de reducir nitrato a nitrito asociándose al cofactor presente en los extractos del tipo silvestre, puede deberse a que en dicha diaforasa queden restos de un cofactor inactivo por la mutación provocada en dicha estirpe, que imposibilita la asociación activa diaforasa-cofactor. Un comportamiento similar se ha observado en los mutantes cnx de Aspergillus nidulans, que carecen de actividad nitrato reductasa terminal y poseen actividad diaforasa al igual que el mutante 104 de Chlamydomonas (33).

El cofactor presente en el tipo silvestre de Chlamydomonas es muy inestable, y especialmente sensible al tratamiento térmico (45°C, 5 min) (Tablas XXIII y XXIV), lo cual se había descrito también para el de Rhodospirillum rubrum (50).

El papel de la actividad diaforasa en el proceso de inactivación de la nitrato reductasa terminal, en elgas verdes y plantas superiores, es un punto todavía no resuelto. Según algunos autores, la actividad diaforasa es necesaria para que la nitrato reductasa terminal pueda ser inactivada (4). De esta manera podría explicarse el efecto inacti

vante, in vitro, de los piridín nucleótidos reducidos. Otros autores han sugerido que, en espinacas, la diaforasa de la nitrato reductasa solo toma parte en la reacción de reducción de nitrato con NAD(P)H, y no participa en la regulación de la actividad terminal (54,55,93). En Chlamydomonas reinhardi, los resultados presentados en este trabajo sugieren que es necesaria la presencia de una diaforasa activa, en el complejo nitrato reductasa, para que se pueda producir la inactivación de la terminal, con NAD(P)H, ya que la pérdida de la actividad diaforasa en el mutante 305 trae consigo el que la nitrato reductasa terminal de dicha estirpe no se pueda inactivar por piridín nucleótidos reducidos (Tablas XXV y XXVI). El FAD, ha sido descrito como necesario para la inactivación por NAD(P)H de la actividad nitrato reductasa terminal de espinaca, en una preparación enzimática cuya actividad diaforasa había sido destruida por p-HMB. Sin embargo al añadir FAD a la nitrato reductasa del mutante 305 de Chlamydomonas no se consiguió ninguna inactivación por NAD(P)H (Tabla XXVI).

Se ha investigado también, mediante el mutante 305, el posible efecto de la actividad diaforasa en la inactivación fisiológica de la nitrato reductasa, comprobándose que el enzima de dicha estirpe, que carece de diaforasa,

no se inactiva prácticamente, in vivo, por tratamiento con amonio o metilamina (Tabla XXVIII). No obstante, su nitrato reductasa terminal es capaz de inactivarse por reducción con ditionito a través de metil viológeno (Tabla XXVII). Esto sugiere que la inactivación fisiológica de la nitrato reductasa de Chlamydomonas reinhardi ocurre con el concurso de la actividad diaforasa del complejo. No se puede descartar la posibilidad de que la mutación haya provocado, además de la pérdida de la actividad diaforasa, la destrucción de una actividad reguladora como la propuesta por ciertos autores en el enzima de espinaca (55).

1 Se han aislado trece mutantes de Chlamydomonas reinhardi incapaces de crecer en nitrato. Ocho de ellos conservan sólo la actividad diaforasa del complejo nitrato reductasa. Uno, presenta solamente la actividad terminal de dicho complejo. Otros dos han perdido todas las actividades enzimáticas asociadas a la nitrato reductasa, y por último, dos conservan niveles normales en todas las actividades asociadas al complejo enzimático. Todos los mutantes obtenidos conservan activa la nitrito reductasa. De todos estos mutantes, el 104, que sólo tiene actividad diaforasa y el 305 que carece de esta actividad y con actividad nitrato reductasa terminal, han sido estudiados con más detalles en este trabajo.

2 El valor del coeficiente de sedimentación de la nitrato reductasa del tipo silvestre es 10 S, mientras que el de la diaforasa de los mutantes carentes de actividad terminal es mucho menor (3,5 S). El enzima del mutante carente de actividad diaforasa (305) presenta un coeficiente de sedimentación de 8,3 S. Por otra parte, el peso molecular de la diaforasa del mutante 104, sin actividad terminal, es 67.000, mucho menor que el de la nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi (500.000).

- 3 La actividad diaforasa de los mutantes deficientes en nitrato reductasa terminal, se reprime por amonio al igual que la diaforasa y la nitrato reductasa del tipo silvestre, lo que podría indicar que la proteína con actividad diaforasa, de esos mutantes, es una parte del complejo enzimático nitrato reductasa del tipo silvestre.

- 4 Estudios de centrifugación en gradientes de sacarosa indican que el complejo nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi, 6145 c, se disocia en subunidades que siguen mostrando actividad diaforasa y han perdido las actividades terminal y total del enzima.

- 5 Las diaforasas del mutante 104 y tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi utilizan los mismos donadores (NAD(P)H) y aceptores de electrones (ferricianuro, DPIP, menadiona, citocromo c) con una eficiencia similar. El NADPH es más efectivo que el NADH como donador de electrones de ambas diaforasas, y de la nitrato reductasa del tipo silvestre, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de algas verdes estudiadas, cuya diaforasa utiliza exclusivamente NADH.

- 6 A partir de estudios cinéticos, se han deducido valores de K_M similares, para donadores y aceptores, de la diaforasa en las estirpes silvestre y mutante 104.

- 7 Los estudios realizados con inhibidores y tratamiento térmico indican que el FAD es un cofactor de la proteína con actividad diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas reinhardi. Asimismo se muestra la presencia de grupos -SH, necesarios para la actividad, en dicha proteína. El comportamiento de la diaforasa del mutante 104, frente a estos tratamientos, es esencialmente idéntico al de la del tipo silvestre.

- 8 La actividad NAD(P)H-citocromo c reductasa del mutante 104 presenta un mecanismo cinético Ping-Pong Bi Bi, igual que el de la diaforasa, asociada a la nitrato reductasa, del tipo silvestre, y diferente del mecanismo cinético secuencial ordenado característico de la mayoría de las deshidrogenasas estudiadas hasta el momento. Las constantes cinéticas de las diaforasas de las dos estirpes, presentan valores muy similares, para NAD(P)H y citocromo c, calculadas a partir de las representaciones secundarias.

- 9 Los estudios fisiológicos realizados parecen indicar que la actividad NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 es independiente de la concentración de Fe^{++} en el medio de cultivo. De lo anteriormente expuesto se puede concluir que, por mutación, se ha aislado por primera vez la actividad diaforasa del complejo enzimático NAD(P)H-nitrato reductasa del

alga verde Chlamydomonas reinhardi.

- 10 Se ha puesto de manifiesto, en el tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi, la existencia de un cofactor capaz de restaurar la actividad NADPH-nitrato reductasa del mutante nit-1 de Neurospora crassa (sin actividad nitrato reductasa terminal ni total).

- 11 Este cofactor se detecta en células que tienen reprimida la nitrato reductasa, es bastante inestable, y muy sensible al calor.

- 12 El estudio de la regulación de la actividad nitrato reductasa en el mutante 305, carente de actividad diaforasa, indica claramente que es necesaria una diaforasa activa para que pueda tener lugar la inactivación de la actividad terminal de la nitrato reductasa, tanto in vivo como in vitro.

TABLA I

EFFECTO DEL ClO_3K SOBRE EL CRECIMIENTO DE Chlamydomonas reinhardi CULTIVADA EN DISTINTAS FUENTES DE NITROGENO

Tratamiento	Fuente de nitrógeno	Crecimiento
Ninguno	Aspártico	+
Ninguno	NH_4^+	+
+ CO_3K 0,1 M	NH_4^+	+
+ ClO_3K 0,1 M	Aspártico	-

Células de Chlamydomonas 6145c, procedentes de medios con nitrato, se transfirieron a otros con aspártico (0,5 mM) o amonio (8 mM) en presencia y ausencia de clorato potásico. Después de 24 horas se estimó el crecimiento por el número de células vivas, sembrando en placas de Petri, alícuotas convenientemente diluidas de cada cultivo.

TABLA II

CARACTERIZACION DE MUTANTES DE Chlamydomonas reinhardi AFECTADAS EN EL SISTEMA
REDUCTOR DE NITRATO

Estirpe	Actividades enzimáticas (%)			
	NADH-cit.c Rasa	FMNH ₂ -NO ₃ Rasa	NADH-NO ₃ Rasa	MVH-NO ₂ Rasa
Tipo Silvestre 21 gr 6145 c	100	100	100	100
102	21	4	7	477
103	6	6	4	342
104	43	4	9	470
106	20	5	15	485
203	27	0	8	91
301	40	5	1	173
305	6	200	3	130
307	71	5	3	126
408	61	8	6	86
409	61	10	7	113
412	17	10	7	108
510	83	88	121	98
514	107	101	79	118

Las distintas estirpes analizadas se cultivaron, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento, en medios con NO_2K 4 mM (102, 103, 104 y 106) o con ClNH_4 10 mM (203, 301, 305, 307, 408, 409, 412, 510 y 514) y posterior desrepresión con NO_2K 2 mM, durante 6 horas. Seguidamente se recogieron las células, se prepararon sus correspondientes extractos acelulares y se ensayaron sus actividades enzimáticas, según se indica en Materiales y Métodos. Los 100% de actividad para la estirpe 21 gr fueron: NADH-cit.c Rasa, 70; $\text{FMNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa, 20; NADH- NO_3 Rasa, 18; y NADH- NO_2 Rasa, 53 miliunidades/mg proteína. Para la estirpe 6145 c los valores fueron: 60; 6; 16 y 90 miliunidades/mg proteína respectivamente. Los mutantes 102, 103, 106 y 203 se obtuvieron a partir de la estirpe 21 gr y los (valores) de la 6145 c.

restantes

TABLA III

CARACTERISTICAS DE LOS MUTANTES DE Chlamydomonas reinhardi AFECTADOS EN LA ASIMILACION DE NITRATO

Estirpe	Actividades enzimáticas			
	NADH-cit.c Rasa	FMN ₂ -NO ₃ Rasa	NADH-NO ₃ Rasa	MVH-NO ₂ Rasa
102,104,106,203 301,307,408,409	+	-	-	+
305	-	+	-	+
103,412	-	-	-	+
510,514	+	+	+	+

TABLA IV

COEFICIENTES DE SEDIMENTACION DE LA NITRATO REDUCTASA
DEL TIPO SILVESTRE 21 gr Y ESTIRPES MUTANTES DE
Chlamydomonas reinhardi

Estirpe	Actividades enzimáticas		S _{20,w}
	NADH-cit. c Rasa	FMNH ₂ -NO ₃ Rasa	
Tipo silvestre	+	+	10
Mutantes 102, 104,307	+	-	3,5
Mutante 305	-	+	8,3

TABLA V

ACTIVIDADES DEL COMPLEJO NITRATO REDUCTASA DEL TIPO SILVESTRE Y MUTANTE 104
DE Chlamydomonas reinhardi

Estirpe	Actividad específica (mU/mg proteína)			
	NADH-cit. <u>c</u> Rasa	FMNH ₂ -NO ₃ Rasa	NADH-NO ₃ Rasa	MVH-NO ₂ Rasa
Tipo silvestre	53	20	18	53
Mutante 104	30	1	1	249

Las condiciones experimentales son las mismas de la Tabla II.

TABLA VI

NADH Y NADPH COMO DONADORES DE ELECTRONES DE LA NITRATO REDUCTASA DEL TIPO SILVESTRE DE Chlamydomonas reinhardi

Donador de electrones	Concentración (mM)	Actividad NO ₂ ⁻ Rasa (nmoles de NO ₂ ⁻ formado por min)
NADH	0,3	64
NADPH	0,3	65

La actividad nitrato reductasa se estimó por la cantidad de nitrato formado, como se explica en Materiales y Métodos, usando 1 mg de enzima purificado del tipo silvestre de Chlamydomonas.

TABLA VII

NADH Y NADPH COMO DONADORES DE ELECTRONES DE LA DIAFORASA DEL MUTANTE 104
DE Chlamydomonas reinhardi

Donador de electrones	Concentración (mM)	Actividad diaforasa (nmoles de citocromo <u>c</u> reducido por min)
NADH	0,6	140
NADPH	0,6	157

La actividad se determinó con 0,6 mg de diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas siguiendo la reducción de citocromo c, como se indica en Materiales y Métodos.

TABLA VIII

NADH Y NADPH COMO DONADORES DE ELECTRONES DE LA DIAFORASA DEL TIPO SILVESTRE
DE Chlamydomonas reinhardi

Donador de electrones	Concentración (mM)	Actividad diaforasa (nmoles de citocromo <u>c</u> reducido por min)
NADH	0,6	140
NADPH	0,6	135

La actividad se determinó con 1 mg de nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas, siguiendo la reducción de citocromo c, como se indica en Materiales y Métodos.

TABLA IX

K_M s DE LA NITRATO REDUCTASA Y DIAFORASA DEL TIPO SILVESTRE Y DE LA DIAFORASA DEL MUTANTE 104 DE Chlamydomonas reinhardi PARA LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS

Donador de electrones	K_m (μM)			
	Nitrato reductasa		Diaforasa	
	Tipo silvestre	Mutante 104	Tipo silvestre	Mutante 104
NADH	37	-	50	61
NADPH	8	-	25	30

TABLA X

REPRESION POR AMONIO DE LA NAD(P)H-DIAFORASA DE LOS TIPOS SILVESTRE Y MUTANTE 104
DE Chlamydomonas reinhardi

Estirpe	Fuente de nitrógeno	Actividad específica (mU/mg proteína)	
		NADH-diaforasa	NADPH-diaforasa
Tipo silvestre	NO_3^- , 4 mM	60	65
Tipo silvestre	NH_4^+ , 8 mM	3	4
Mutante 104	NO_3^- , 4 mM	42	50
Mutante 104	NH_4^+ , 8 mM	3	3

Las actividades enzimáticas se determinaron en extractos acelulares obtenidos a partir de células cultivadas en medios con ClNH_4^+ y transferidas posteriormente a medios con las fuentes de nitrógeno que se indica. Otras condiciones del experimento se describen en Materiales y Métodos.

TABLA XI

ACEPTORES DE ELECTRONES DE LA NADPH-DIAFORASA DEL TIPO
SILVESTRE DE Chlamydomonas reinhardi

Aceptor de electrones	Concentración (mM)	NADPH-oxidado (nmoles/min)
Ninguno	--	0
Ferricianuro	0,66	159
DPIP	0,14	53
Citocromo <u>c</u>	0,10	15
Menadiona	0,10	41
BV	0,33	10
MV	0,33	9
FMN	0,14	13
FAD	0,14	17
NO ₃ ⁻	3,30	15

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 3 ml: 0,3 mg de nitrato reductasa; 250 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; y los distintos aceptores a las concentraciones que se indican en la tabla. La reacción se comenzó añadiendo 0,3 μ moles de NADPH. La actividad se midió espectrofotométricamente por desaparición de NADH a 340 nm, excepto en los casos del ferricianuro, DPIP y citocromo c, en los que se estimó por la variación de la absorbancia de la solución coloreada a 420, 620 y 550 nm, respectivamente.

TABLA XII

ACEPTORES DE ELECTRONES DE LA NADPH-DIAFORASA DEL MUTANTE 104
DE Chlamydomonas reinhardi

Aceptor de electrones	Concentración (mM)	NADPH-oxidado (nmoles/min)
Ninguno	--	0
Ferricianuro	0,66	157
DPIP	0,14	52
Citocromo <u>c</u>	0,10	17
Menadiona	0,10	33
BV	0,33	10
MV	0,33	8
FMN	0,14	9
FAD	0,14	11
NO ₃ ⁻	3,30	0

Las condiciones son las descritas en la Tabla X(X), salvo que la mezcla de reacción contenía 0,3 mg de enzima.

TABLA XIII

ACEPTORES DE ELECTRONES DE LA NADH-DIAFORASA DEL TIPO SILVESTRE DE Chlamydomonas reinhardi

Aceptor de electrones	Concentración (mM)	NADH-oxidado (nmoles/min)
Ninguno	--	0
Ferricianuro	0,66	54
DPIP	0,14	28
Citocromo <u>c</u>	0,10	14
Menadiona	0,10	25
BV	0,33	9
MV	0,33	3
FMN	0,14	3
FAD	0,14	4
NO ₃ ⁻	3,30	10

Las condiciones son las indicadas en la Tabla XXI salvo que la mezcla de reacción contenía 0,2 mg de enzima y 0,3 µmoles de NADH.

TABLA XIV

ACEPTORES DE ELECTRONES DE LA NADH-DIAFORASA DEL MUTANTE 104
DE Chlamydomonas reinhardi

Aceptor de electrones	Concentración (mM)	NADH-oxidado (nmoles/min)
Ninguno	--	0
Ferricianuro	0,66	77
DPIP	0,14	31
Citocromo <u>c</u>	0,10	20
Menadiona	0,10	29
BV	0,33	12
MV	0,33	4
FMN	0,14	2
FAD	0,14	4
NO ₃ ⁻	3,30	0

Las condiciones son las descritas en la Tabla X| , salvo que la mezcla de reacción contenía 0,2 mg de enzima y 0,3 μ moles de NADH.

TABLA XV

K_M s DE LA NAD(P)H-DIAFORASA DEL TIPO SILVESTRE Y DEL MUTANTE 104 DE Chlamydomonas reinhardi PARA DISTINTOS ACEPTORES DE ELECTRONES

Aceptor de electrones	K_M (μM)			
	NADH-diaforasa		NADPH-diaforasa	
	Tipo silvestre	Mutante 104	Tipo silvestre	Mutante 104
Citocromo <u>c</u>	17	16	15	16
DPIP	28	15	28	21
Ferricianuro	34	34	34	34

TABLA XVI

EFFECTO DE DIVERSOS INHIBIDORES Y TRATAMIENTOS SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO
NITRATO REDUCTASA DEL TIPO SILVESTRE DE Chlamydomonas reinhardi

Tratamiento o Adición	Actividad enzimática (%)				
	NADH- diaforasa	NADPH- diaforasa	NADH- NO ₃ Rasa	NADPH- NO ₃ Rasa	FMNH ₂ - NO ₃ Rasa
Ninguno	100	100	100	100	100
Calentamiento a 45°C, 5 min	15	15	11	10	90
pHMB 10 M	0	0	0	0	93
N ₃ Na 0,5 mM	100	100	2	0	5
CNK 0,5 mM	100	100	0	0	4

Las actividades se determinaron con 0,3 mg de enzima en las condiciones descritas en Materiales y Métodos. El 100% de actividad fué para la NAD(P)H-diafo-
rasa, 10,5 mU; para la NADH-NO₃Rasa, 4,75 mU; para la NADPH-NO₃Rasa, 6 mU; y para
la FMNH₂-NO₃Rasa, 6,2 mU.

TABLA XVII

EFEECTO DE DIVERSOS INHIBIDORES Y TRATAMIENTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA DIAFORASA DEL MUTANTE 104 DE Chlamydomonas reinhardi

Tratamiento o adición	Actividad enzimática (%)	
	NADH-diaforasa	NADPH-diaforasa
Ninguno	100	100
Calentamiento a 45°C, 5 min	12	13
p-HMB 10 µM	0	0
N ₃ Na 0,5 mM	80	83
CNK 0,5 mM	86	90

Las actividades enzimáticas se determinaron con 0,25 mg de diaforasa, según se detalla en Materiales y Métodos. El 100% de actividad correspondiente a los controles sin tratamiento fué 15,7 mU para la NADH-diaforasa, y 16,4 mU para la NADPH-diaforasa.

TABLA XVIII

EFFECTO PROTECTOR DE LAS FORMAS OXIDADA Y REDUCIDA DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS FRENTE A LA INACTIVACION DE LA NADPH-DIAFORASA DEL MUTANTE 104 DE Chlamydomonas reinhardi POR TRATAMIENTO CON p-HMB

Tratamiento	Actividad (%)
Ninguno	100
p-HMB	14
p-HMB, NADPH	94
p-HMB, NADH	66
p-HMB, NADP ⁺	17
p-HMB, NAD ⁺	14

La diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas (0,17 mg) se preincubó en un volumen de 0,3 ml durante 2,5 min a temperatura ambiente con 25 µmoles de Tris-ClH, pH 7,5, 6 µmoles de p-HMB; y 0,3 µmoles de los piridín nucleótidos que se indican. Acabada la preincubación se completaron las mezclas con los reactivos del ensayo standard y se midieron las correspondientes actividades El 100% de actividad correspondiente al control sin tratamiento fué 12,6 mU.

TABLA XIX

VALORES DE K_a Y K_b DE LA DIAFORASA DEL TIPO SILVESTRE Y MUTANTE 104 DE Chlamydomonas reinhardi PARA EL NAD(P)H Y CITOCROMO c

Actividad enzimática	Sustrato	K_a, K_b (μM) ^a	
		Silvestre	Mutante 104
NADH-diaforasa	NADH	44	30
	cit. <u>c</u>	12	7
NADPH-diaforasa	NADPH	5	9
	cit. <u>c</u>	7	6

^a K_a (NAD(P)H); K_b (citocromo c)

TABLA XX

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE HIERRO EN EL MEDIO DE CULTIVO
SOBRE LA ACTIVIDAD NAD(P)H-DIAFORASA DEL MUTANTE 104
DE Chlamydomonas reinhardi

/Fe ⁺⁺ / (µM)	Actividad específica (mU/mg proteína)	
	NADH-diaforasa	NADPH-diaforasa
0	36	43
0,1	29	36
1	34	44
10	27	32
100	34	42

Células del mutante 104 de Chlamydomonas se cultivaron en medios con ClNH₄ en ausencia de hierro. Se recogieron por centrifugación, y una vez lavadas se transfirieron a medios con NO₃K con las concentraciones de hierro que se indican, en donde se mantuvieron durante 5 horas para desreprimir la diaforasa. Tras este tratamiento se recogieron las células, se prepararon sus extractos acelulares y se determinaron las actividades enzimáticas que se indican, según se explica en Materiales y Métodos.

TABLA XXI

RECONSTITUCION DE LA ACTIVIDAD NADPH-NITRATO REDUCTASA DEL MUTANTE nit-1 DE Neurospora crassa POR COMPLEMENTACION CON EXTRACTOS ACELULARES DEL TIPO SILVESTRE DE Chlamydomonas reinhardi CULTIVADO EN AMONIO

Sistema	Actividad NADPH-NO ₃ Rasa (nmoles NO ₂ ⁻ formado/20 min)	
	Tratamiento I	Tratamiento II
<u>nit-1</u> ^a	0,0	0,0
<u>Neurospora</u> ^b	2,3	3,0
<u>Chlamydomonas</u>	5,0	6,0
<u>nit-1</u> + <u>Neurospora</u>	51,2	67,5
<u>nit-1</u> + <u>Chlamydomonas</u>	31,8	42,0

Los extractos enzimáticos de cada sistema se obtuvieron triturando en morteros las estirpes indicadas. En el caso de las mezclas, se trituraron en un mismo mortero pesos iguales de las estirpes que las constituían. Se prepararon los correspondientes extractos acelulares y se determinó la actividad NADPH-nitrato reductasa con 0,2 ml de cada uno, según se indica en Materiales y Métodos. En el tratamiento I los distintos sistemas se preincubaron durante 30 min a temperatura ambiente. En el tratamiento II, después de preincubar 30 min a temperatura ambiente, los sistemas se mantuvieron 14 horas a 0°C. La concentración de proteína de los extractos fué de 10,5, 11, 3,5, 12 y 6 mg/ml según aparecen de arriba a bajo en la tabla.

^aMutante nit-1 de Neurospora cultivado en amonio e inducido en nitrato.

^bTipo silvestre de Neurospora cultivado en amonio.

TABLA XXII

RECONSTITUCION DE LA ACTIVIDAD NADPH-NITRATO REDUCTASA DEL MUTANTE nit-1 DE Neurospora crassa POR COMPLEMENTACION DE LOS EXTRACTOS ACELULARES DE DICHO MUTANTE CON LOS DEL TIPO SILVESTRE DE Chlamydomonas reinhardi CULTIVADO EN AMONIO

Sistema	Actividad enzimática (nmoles NO ₂ ⁻ formado/20 min)	
	NADPH-NO ₃ Rasa	MVH-NO ₃ Rasa
<u>nit-1</u> ^a	0	0
<u>Chlamydomonas</u> ^b	9	9
<u>nit-1</u> + <u>Chlamydomonas</u>	83	63

Los extractos de nit-1 y Chlamydomonas se obtuvieron independientemente, y se preparó una mezcla con igual volumen de cada uno. Los tres sistemas se preincubaron durante 2,5 horas a temperatura ambiente tras lo cual se determinó en ellos las actividades que se indican, siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. La concentración de proteína de los extractos fué de 10 mg/ml para el de nit-1 y 3 mg/ml para el de Chlamydomonas.

^aMutante nit-1 de Neurospora cultivado en amonio e inducido en nitrato.

^bTipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi, 6145 c, cultivada en amonio.

TABLA XXIII

ESTABILIDAD DEL COFACTOR DE Chlamydomonas reinhardi FRENTE A DISTINTOS TRATAMIENTOS

Tratamiento	Actividad NADPH-NO ₃ Rasa (nmoles de NO ₂ ⁻ formado/20 min)
Ninguno ^a	83
Extracto acelular de <u>Chlamydomonas</u> a 2°C, 12 horas	50
Extracto acelular de <u>Chlamydomonas</u> + Glutation 1 mM a 2°C, 12 horas	51
Extracto acelular de <u>Chlamydomonas</u> a -20°C, 12 horas	24
Extracto acelular de <u>Chlamydomonas</u> + Glutation 1 mM a 2°C, 12 horas	26

El extracto obtenido a partir de células de Chlamydomonas cultivadas en amonio fué sometido a los tratamientos indicados. Para la complementación se mezclaron estos extractos (3 mg prot./ml) con volúmenes iguales de extracto de nit-1 indicado (10 mg prot./ml) y tras 2,5 horas de incubación, a temperatura ambiente, se determinó la actividad con 0,2 ml de cada mezcla. Ni el extracto de nit-1, ni el de Chlamydomonas tuvieron en ninguno de los casos actividad significativa, cuando se ensayaron por separado.

^a Extracto acelular recién extraído de células de Chlamydomonas cultivadas en amonio.

TABLA XXIV

EFFECTO DEL TRATAMIENTO TERMICO SOBRE LA ESTABILIDAD DEL COFACTOR DE
Chlamydomonas reinhardi

Sistema	Actividad NADPH-NO ₃ Rasa (nmoles NO ₂ ⁻ formado/20 min)
<u>nit-1</u> ^a	0
<u>Chlamydomonas</u> ^b	4
<u>Chlamydomonas</u> calentado a 45°, 5 min	2
<u>nit-1</u> + <u>Chlamydomonas</u>	37
<u>nit-1</u> + <u>Chlamydomonas</u> calentado a 45°, 5 min	4

Los extractos acelulares de Chlamydomonas se sometieron al tratamiento térmico que se indica. Se prepararon mezclas para la complementación con volúmenes iguales de extractos de nit-1 y Chlamydomonas. Tras 3 horas de incubación a temperatura ambiente se determinó la actividad enzimática con 0,2 ml de cada sistema. La concentración de proteína en el extracto de nit-1 fue 11,5 mg/ml, y de 3,7 mg/ml en el de Chlamydomonas.

^a Extracto del mutante nit-1 de Neurospora cultivado en amonio e inducido en nitrato.

^b Extracto de Chlamydomonas cultivada en amonio.

TABLA xxv

ACTIVIDADES ENZIMATICAS DEL COMPLEJO NITRATO REDUCTASA DEL TIPO SILVESTRE Y
MUTANTE 305 DE Chlamydomonas reinhardi

Estirpe	Actividad específica (mU/mg proteína)			
	NADH-cit <u>c</u> Rasa	FMNH ₂ -NO ₃ Rasa	NADH-NO ₃ Rasa	MVH-NO ₂ Rasa
Tipo silvestre	60,0	3,0	15,7	90
Mutante 305	3,7	7,3	0,4	118

Las células del tipo silvestre y mutante 305 de *Chlamydomonas* cultivadas en amonio, se transfirieron a medios con NO₂K 2 mM, como se explica en Materiales y Métodos. Tras 6 h en estos medios, se recogieron las células, se prepararon sus extractos y se analizaron las actividades que se indican (ver Materiales y Métodos).

TABLA XXVI

EFEECTO DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS REDUCIDOS Y EL FAD SOBRE LA ACTIVIDAD FMNH₂-NITRATO REDUCTASA DEL TIPO SILVESTRE Y MUTANTE 305 DE Chlamydomonas reinhardi

Adición	Actividad FMNH ₂ -NO ₃ Rasa (%)	
	Tipo silvestre	Mutante 305
Ninguna	100	100
NADH	18	103
NADPH	16	90
FAD	116	135
NADH, FAD	64	99
NADPH, FAD	66	118

1,5 mg de nitrato reductasa del tipo silvestre y mutante 305 de Chlamydomonas se preincubaron en un volumen final de 1 ml, con 200 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5 y como se indica, 300 nmoles de NAD(P)H y 100 nmoles de FAD. Tras una hora de preincubación a temperatura ambiente se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se ensayó la actividad FMNH₂-nitrato reductasa como se describe en Materiales y Métodos. El 100% de actividad correspondiente al control sin adiciones fué de 10 mU para el tipo silvestre y 13 mU para el mutante.

TABLA XXVII

INACTIVACION POR DITIONITO DE LA ACTIVIDAD FMNH₂-NITRATO
 REDUCTASA DEL TIPO SILVESTRE Y MUTANTE 305 DE
Chlamydomonas reinhardi

Adición	Actividad FMNH ₂ -NO ₃ Rasa (mU/mg proteína)	
	Tipo silvestre	Mutante 305
Ninguna	7,1	18,7
S ₂ O ₄ ⁼	1,1	1,8

La nitrato reductasa del tipo silvestre y mutante 305 de Chlamydomonas, se preincubó en un volumen final de 1 ml con 100 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5, 300 μ moles de metil-viológeno, y donde se indica, 14 nmoles de S₂O₄⁼ y 30 nmoles de CO₃HNa. Tras 2 h de preincubación a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas de 0,1 ml en las que se ensayó la actividad FMNH₂-nitrato reductasa como se indica en Materiales y Métodos.

TABLA XXVIII

EFFECTO DE LA ADICION DE METILAMINA O AMONIO AL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA ACTIVIDAD FMNH₂-NITRATO REDUCTASA DEL TIPO SILVESTRE Y MUTANTE 305 DE Chlamydomonas reinhardi

Tratamiento	Actividad FMNH ₂ -NO ₃ Rasa (mU/mg protefina)			
	Tipo silvestre		Mutante 305	
		+ FeCy		+ FeCy
Ninguno	5,3	25,2	35,7	36,0
+ Metilamina	2,1	17,4	33,6	29,0
+ Amonio	2,2	17	30,0	30,0

Células del tipo silvestre y mutante 305 de Chlamydomonas cultivadas en amonio, se transfirieron a medios con NO₂K 2 mM como se explica en Materiales y Métodos. Tras 5 h en estos medios se añadió metilamina 30 mM ó SO₄(NH₄)₂ 16 mM al medio de cultivo. Al cabo de 2 h se recogieron las células, se prepararon los correspondientes extractos acelulares en los que se analizó la actividad FMNH₂-nitrato reductasa como se describe en Materiales y Métodos.

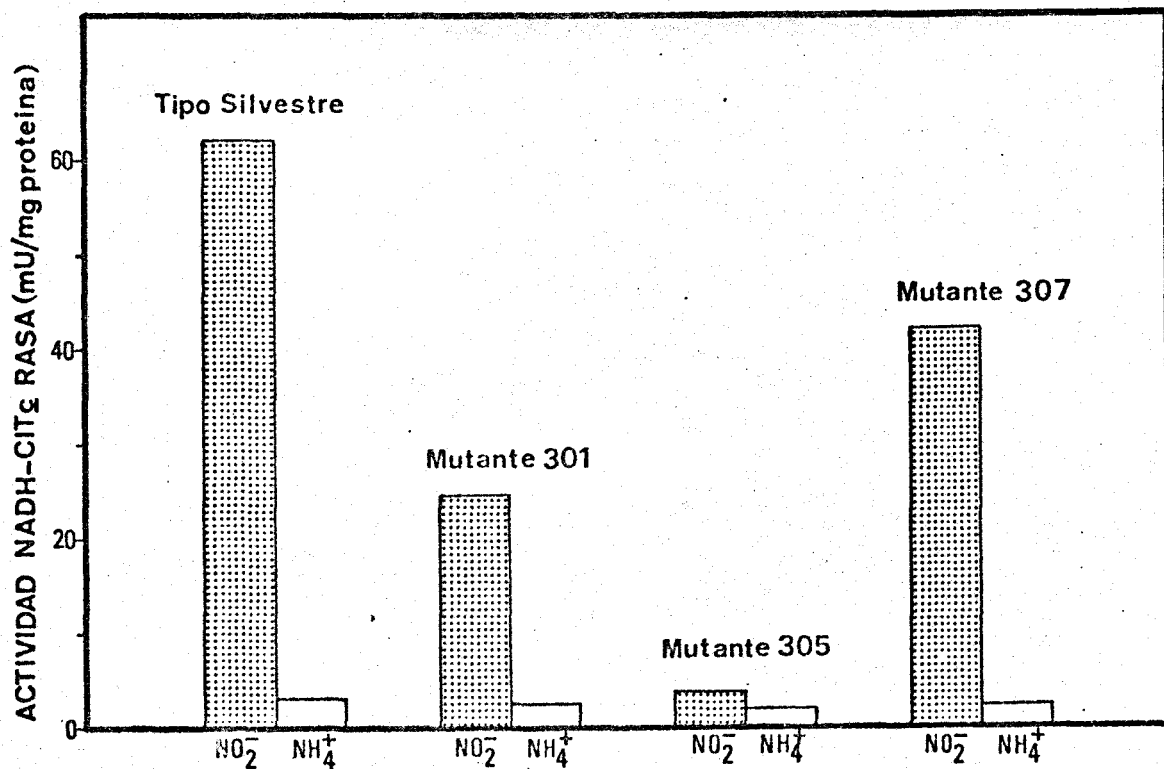


Fig. 1 Actividad NADH-Cit c reductasa del tipo silvestre y de mutantes de *Chlamydomonas reinhardi* cultivados en distintas fuentes de nitrógeno. Las estirpes indicadas se cultivaron en nitrito o amonio, determinandose la actividad NADH-Cit c Rasa en extractos acelulares, según se indica en Materiales y Métodos.

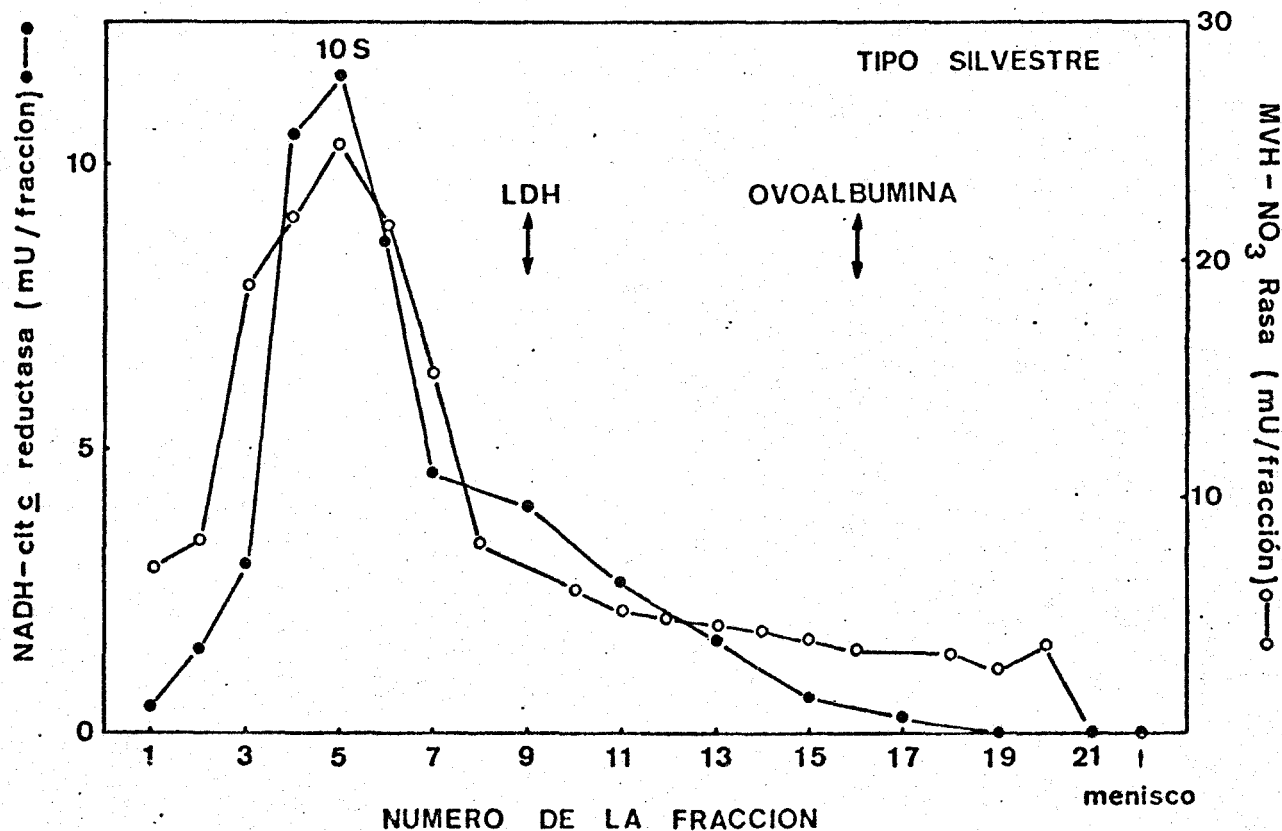


Fig. 2 Sedimentación de la nitrato reductasa del tipo silvestre de *Chlamydomonas reinhardi*, en gradiente de sacarosa. La nitrato reductasa de *Chlamydomonas reinhardi*, estirpe 21 gr se centrifugó durante 12 horas en gradiente de sacarosa. Acabada la centrifugación se recogieron fracciones de 0,15 ml en las que se analizaron las actividades que se indican. Para detalles de la técnica y determinación de actividades, ver Materiales y Métodos.

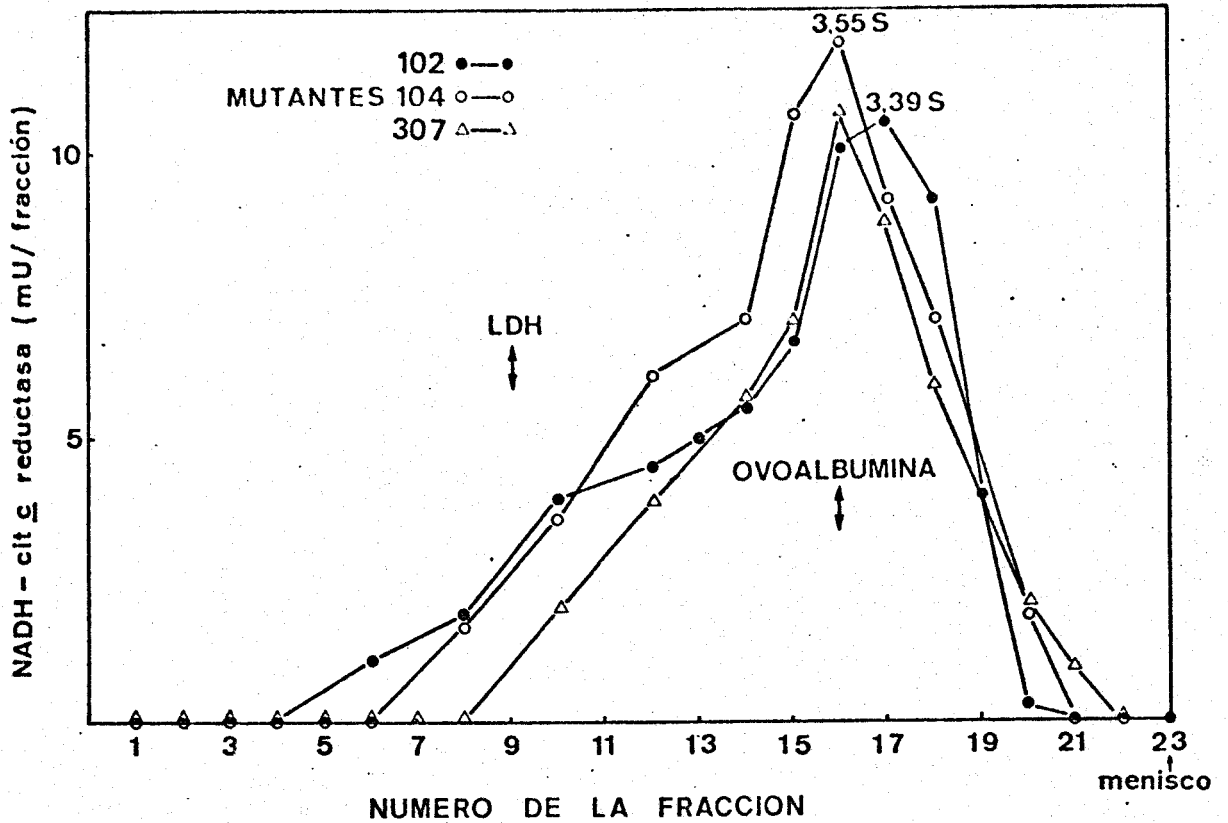


Fig. 3 Sedimentación de la NADH-citocromo *c* reductasa de varios mutantes de *Chlamydomonas reinhardtii* carentes de actividad nitrato reductasa terminal. La diaforasa de los mutantes 102, 104 y 307 de *Chlamydomonas*, se centrifugó en gradientes de sacarosa durante 12 horas. Acabada la centrifugación se recogieron fracciones de 0,15 ml en las que se analizó la actividad NADH-cit *c* Rasa, según se indica en Materiales y Métodos.

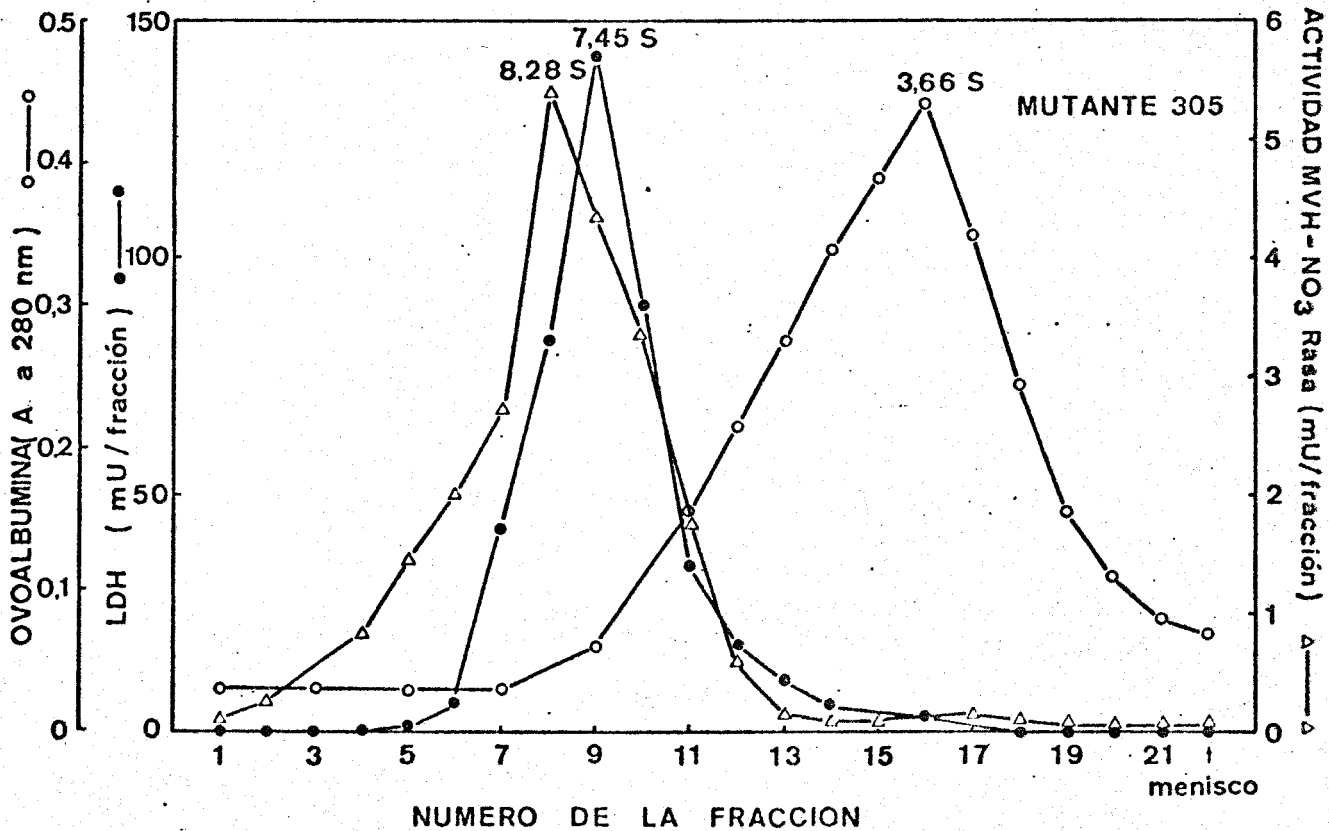


Fig. 4 Sedimentación de la nitrato reductasa terminal del mutante 305 de *Chlamydomonas reinhardtii* carente de actividad diaforasa. La nitrato reductasa del mutante 305 se centrifugó en gradiente de sacarosa durante 12 horas. Acabada la centrifugación se recogieron fracciones de 0,15 ml en las que se analizó la actividad MVH-nitrato reductasa, según se indica en Materiales y Métodos.

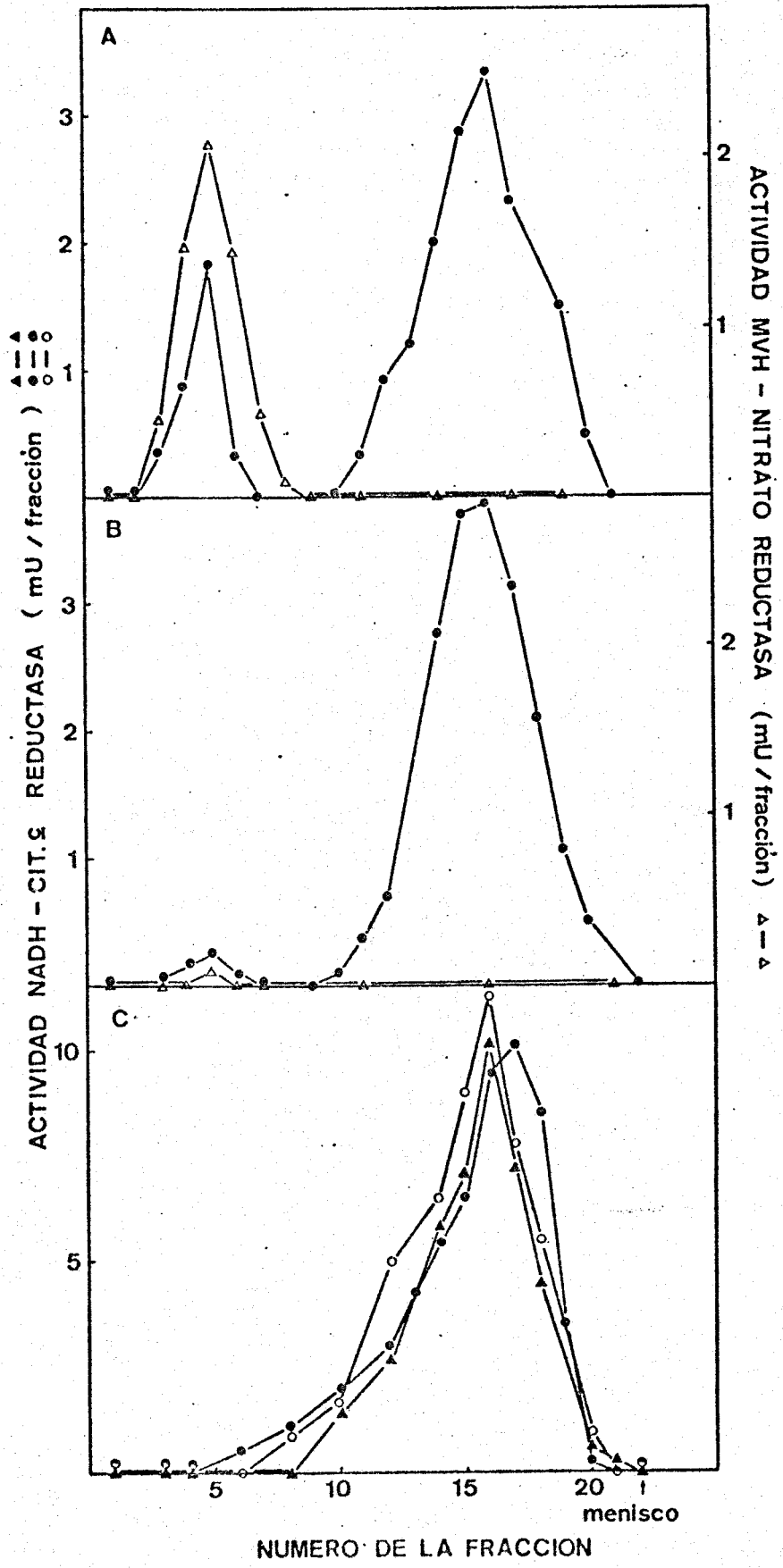


Fig. 5

Fig. 5 Efecto de la lipasa sobre la sedimentación de la nitrato reductasa del tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi 6145 c, en gradiente de sacarosa. La nitrato reductasa de Chlamydomonas se centrifugó en gradiente de sacarosa durante 12 horas. Tras la centrifugación se recogieron fracciones de 0,15 ml, analizándose en ellas las actividades enzimáticas que se indican (ver Materiales y Métodos). (A) Extracto enzimático sin ningún tratamiento. (B) Extracto enzimático tratado con lipasa (2 mg/10 ml extracto) durante 3 horas a 0°C. (C) Diaforasa de mutantes de Chlamydomonas carentes de actividad FMNH₂-NO₃ Rasa: ●-●, mutante 102; ○-○, mutante 104; ▲-▲, mutante 307.

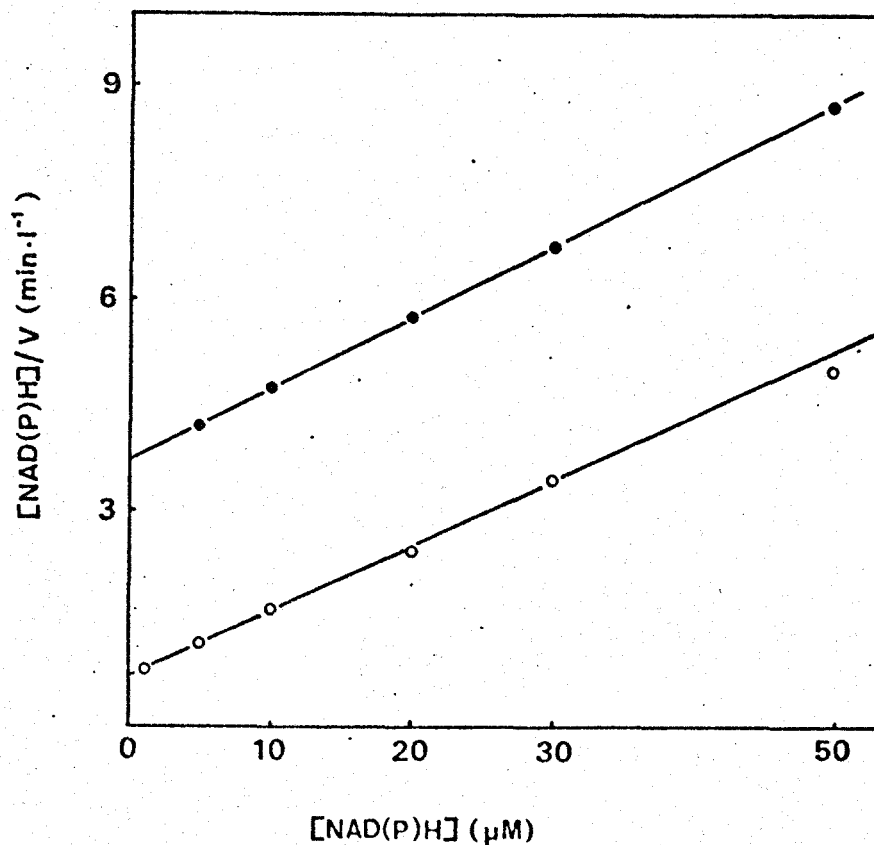


Fig. 6 Representación de Woolf del efecto de la concentración de NAD(P)H sobre la actividad nitrato reductasa del tipo silvestre de *Chlamydomonas reinhardi*. La reacción se siguió espectrofotométricamente por desaparición de NAD(P)H a 340 nm, y se determinó la velocidad inicial en cada caso expresada como nmoles de NAD(P)H oxidado por min. La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: 200 μmoles de Tris-ClH, pH 7,5; 10 μmoles de NO₃K y NAD(P)H a las concentraciones indicadas. Se usaron 0,2 mg de nitrato reductasa en cada determinación. ●-●, NADH; ○-○, NADPH.

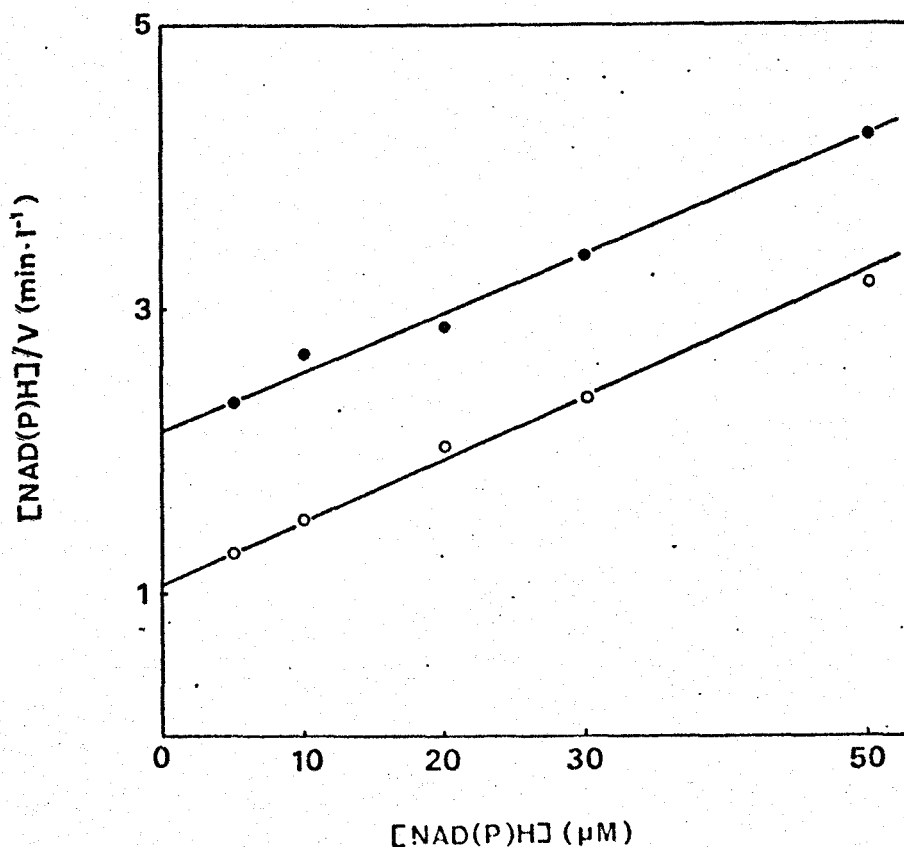


Fig. 7 Representación de Woolf del efecto de la concentración de NAD(P)H sobre la actividad diaforasa del tipo silvestre de *Chlamydomonas reinhardi*. La reacción se siguió espectrofotométricamente por reducción de citocromo c a 550 nm, determinándose la velocidad inicial en cada caso, expresada como nmoles de citocromo c reducido por min. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml: 200 μ moles de Tris-Cl^H, pH 7,5; 150 nmoles de citocromo c oxidado; y NAD(P)H a las concentraciones indicadas. Se usaron 0,2 mg de nitrato reductasa en cada determinación. ●-●, NADH; ○-○, NADPH.

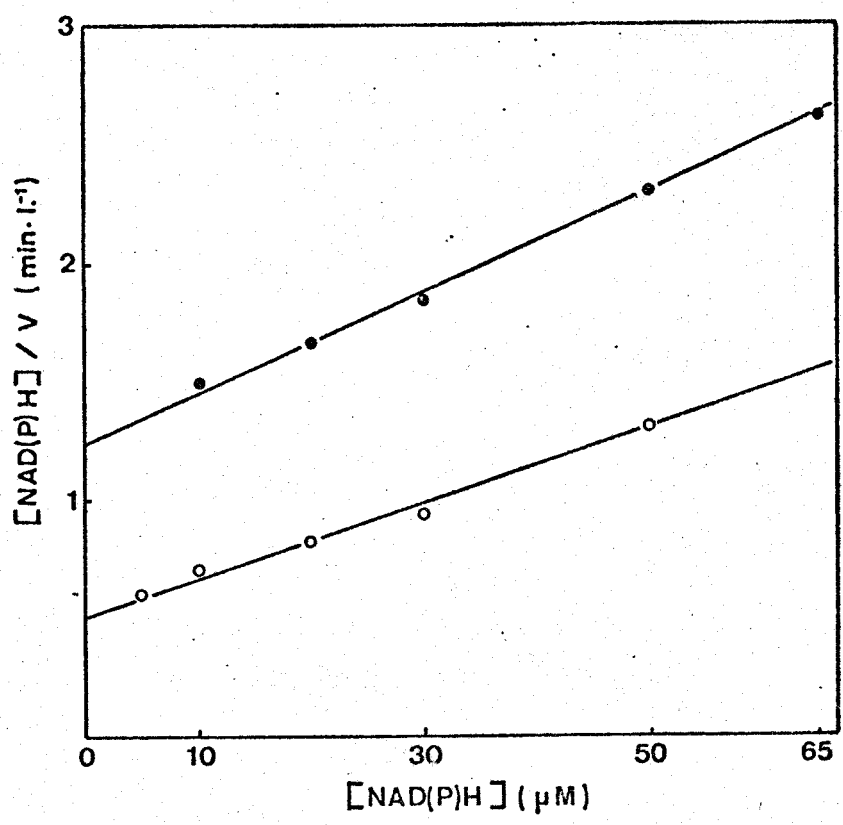


Fig. 8 Representación de Woolf del efecto de la concentración de NAD(P)H sobre la actividad diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardi*. Las condiciones experimentales son idénticas a las de la Fig. , excepto que se usaron 0,12 mg de diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas*, en cada determinación. ●-●, NADH; ○-○, NADPH.

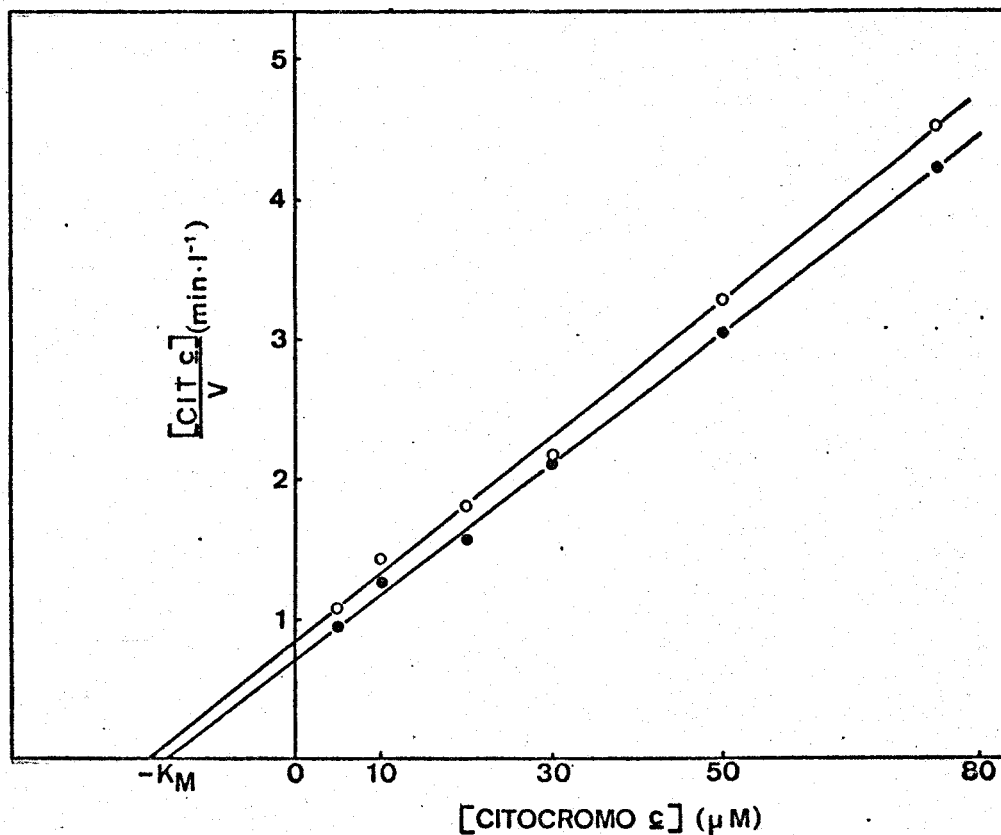


Fig. 9 Representación de Woolf del efecto de la concentración de citocromo c sobre la actividad NAD(P)H-diafo_rasa del tipo silvestre de *Chlamydomonas reinhardi*. En ordenadas se representa el cociente entre la concentración μM de citocromo c, y la velocidad inicial de la reacción expresada como nmoles de citocromo c reducidos por min. La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 2 ml: 0,15 mg de nitrato reductasa; 200 μmoles de Tris-ClH, pH 7,5; y las concentraciones de citocromo c que se indican. La reacción comenzó por la adición de 0,3 μmoles de NADPH (●-●), ó 0,6 μmoles de NADH (O-O). Otras condiciones experimentales se detalla en Materiales y Métodos.

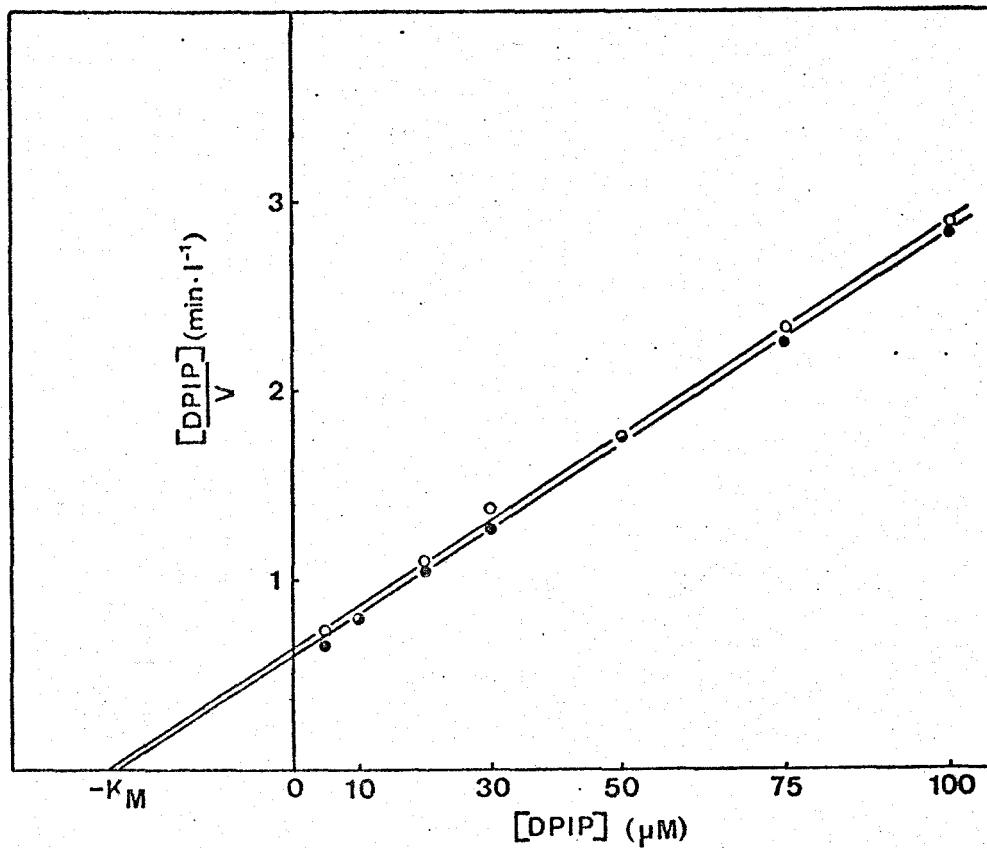


Fig. 10 Representación de Woolf del efecto de la concentración de DPIP sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del tipo silvestre de *Chlamydomonas reinhardtii*. Las condiciones experimentales son las expresadas en la Fig. 9, excepto que se usó DPIP como aceptor de electrones, a las concentraciones que se indican y se emplearon 0,25 mg de nitrato reductasa. ○-○, NADH; ●-●, NADPH.

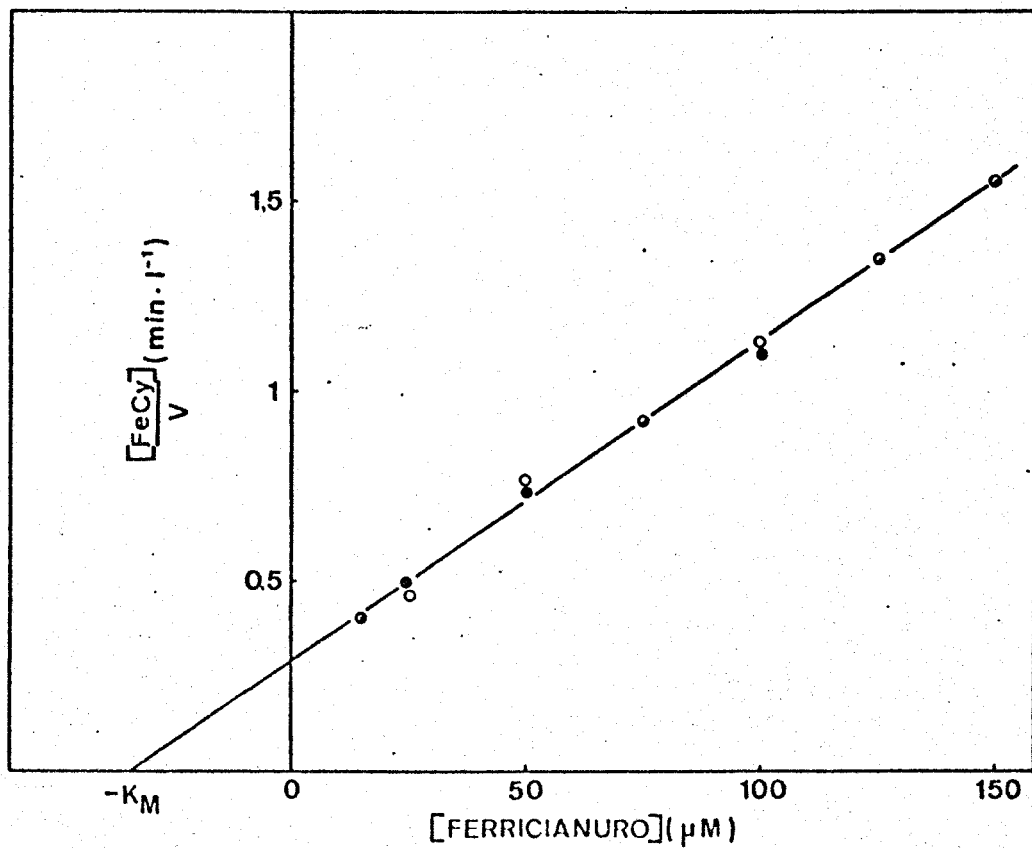


Fig. 11 Representación de Woolf del efecto de la concentración de ferricianuro sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del tipo solvestre de *Chlamydomonas reinhardi*. Las condiciones experimentales son las expresadas en la Fig. 9 salvo que se usó ferricianuro como aceptor de electrones a las concentraciones que se indican y 0,25 mg de nitrato reductasa. ○-○, NADH; ●-●, NADPH.

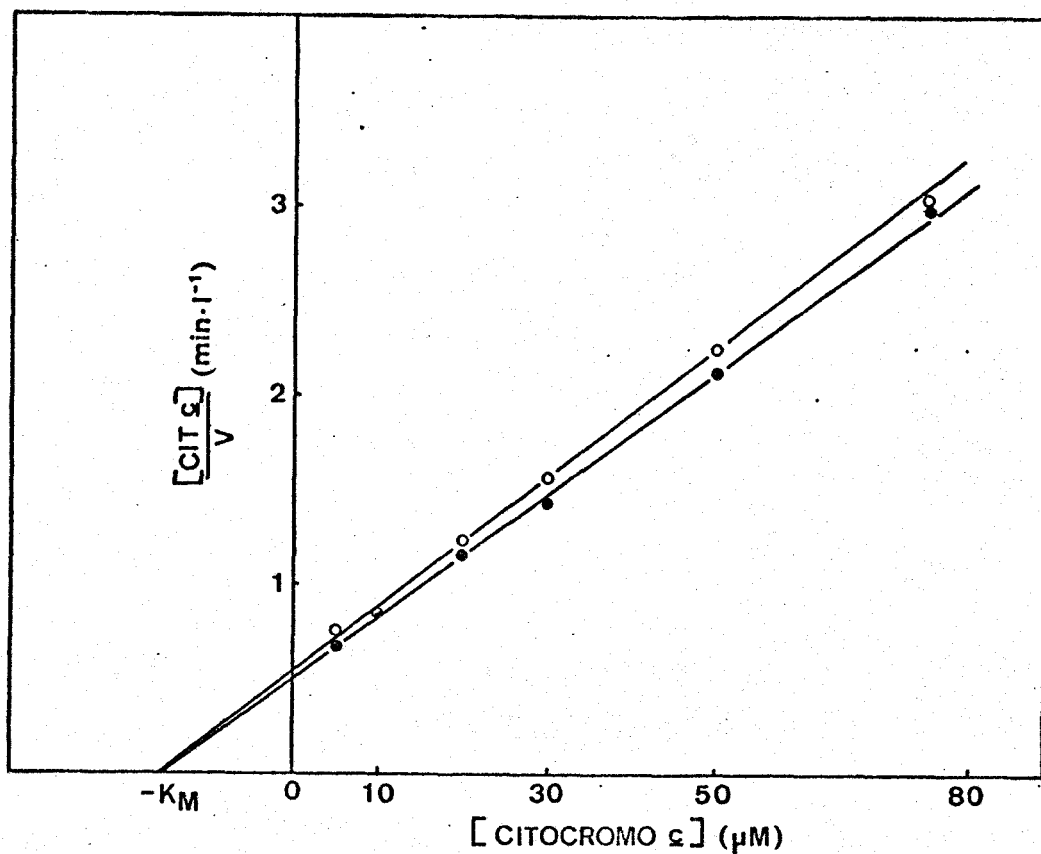


Fig. 12 Representación de Woolf del efecto de la concentración de citocromo c sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardi*. Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 9, excepto que la mezcla de reacción contenía 0,3 mg de enzima. ○-○, NADH; ●-●, NADPH.

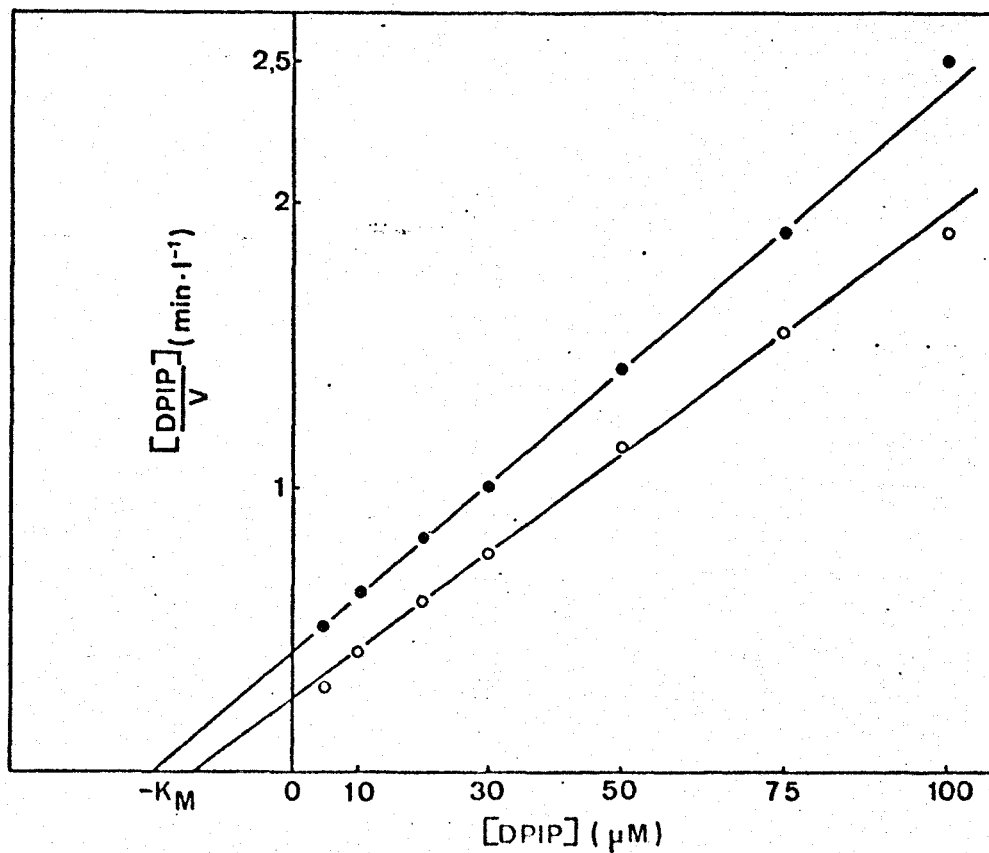


Fig. 13 Representación de Woolf del efecto de la concentración de DPIP sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Las condiciones experimentales son las expresadas en la Fig. 9, salvo que se usó DPIP como aceptor de electrones a las concentraciones que se indican y se emplearon 0,3 mg de enzima. ○-○, NADH; ●-●, NADPH.

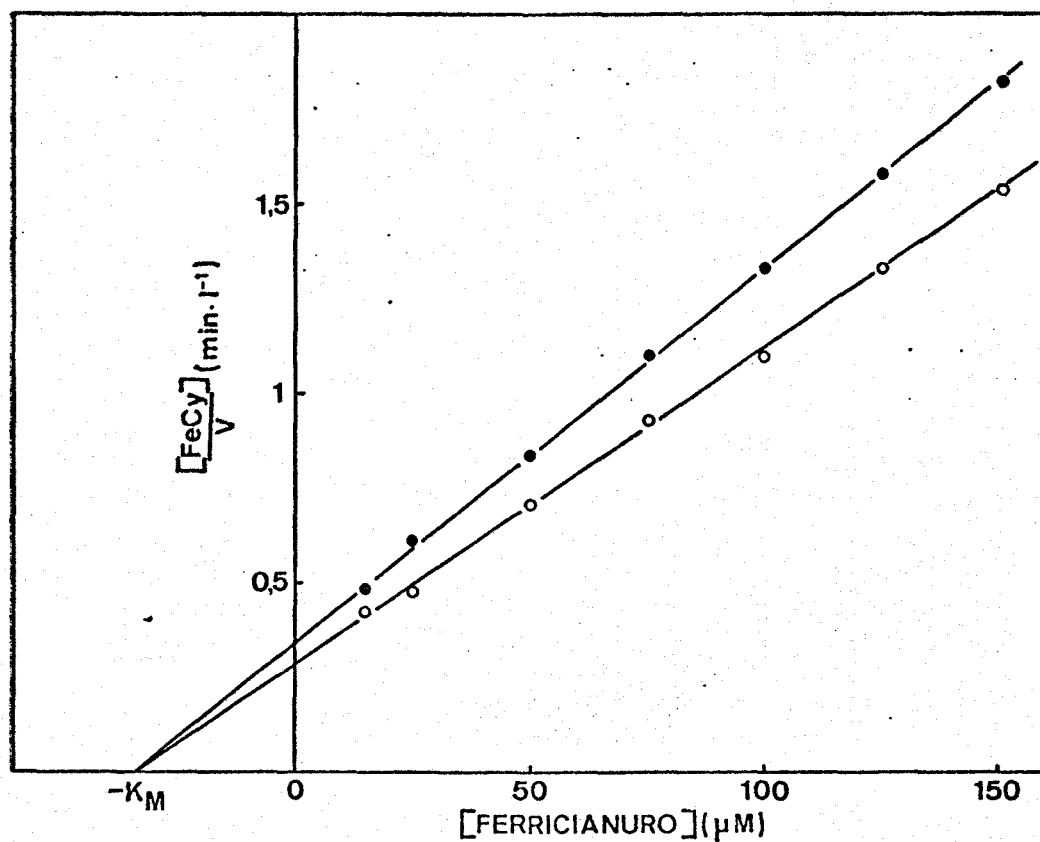


Fig. 14 Representación de Woolf del efecto de la concentración de ferricianuro sobre la actividad NAD(P)H-diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardi*. Las condiciones experimentales son las expresadas en la Fig. 9, salvo que se usó ferricianuro como aceptor de electrones, a las concentraciones que se indican y se emplearon 0,3 mg de enzima. ○-○, NADH; ●-●, NADPH.

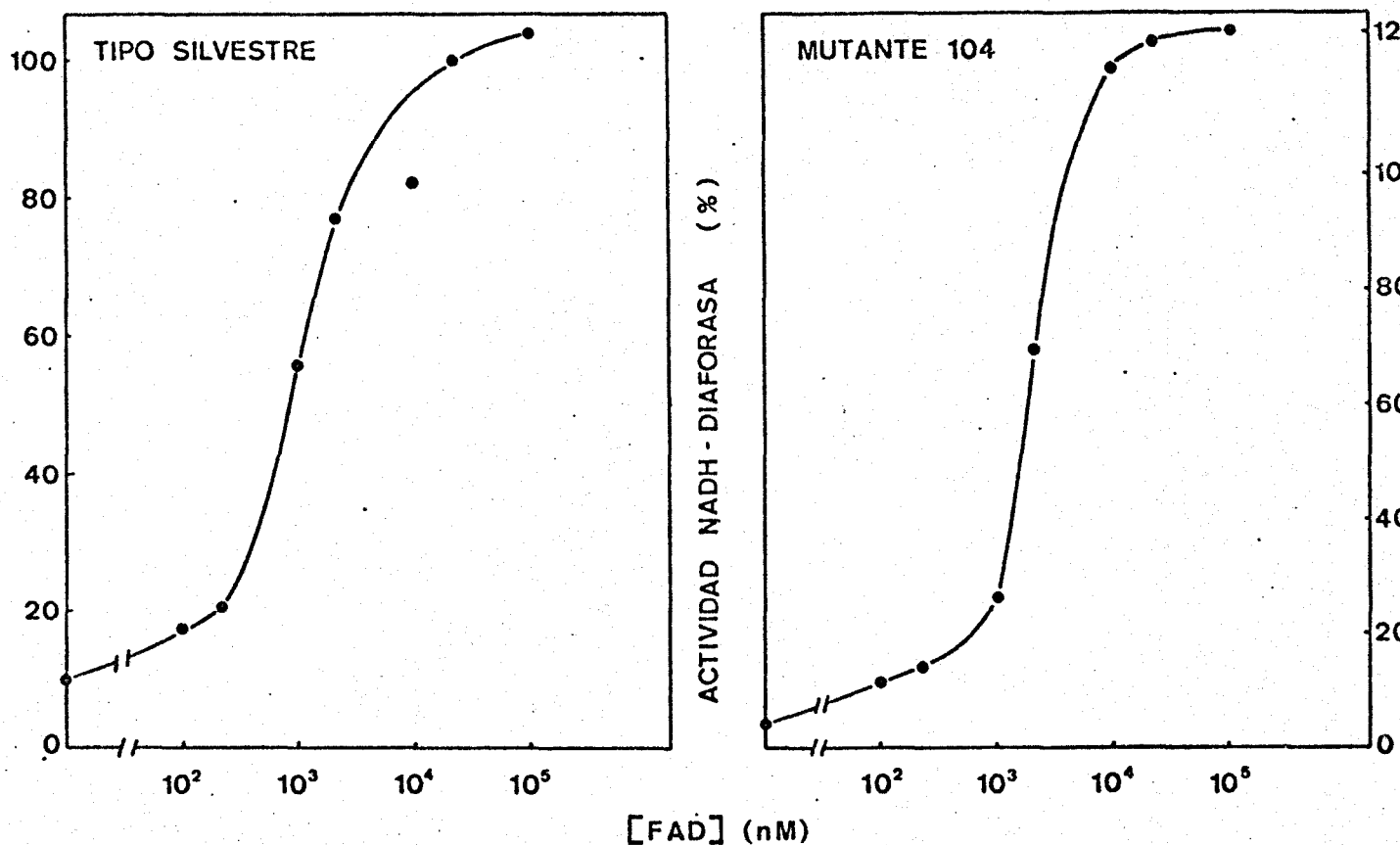


Fig. 15 Efecto de la concentración de FAD frente a la inactivación, por tratamiento térmico, de la NADH-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardi*. La nitrato reductasa del tipo silvestre (0,4mg) o la diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas* (0,5 mg) se preincubaron a 45°C durante 5 min, en volumen final de 1 ml en presencia de 200 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5 y las concentraciones de FAD que se indican. Tras la preincubación se completó la mezcla de reacción hasta 2 ml con los reactivos del ensayo standard, y se determinó la actividad NADH-diaforasa. El 100% de actividad correspondiente al control sin calentar fué 15 mU par la NADH-diaforasa del tipo silvestre y 11 mU para la del mutante.

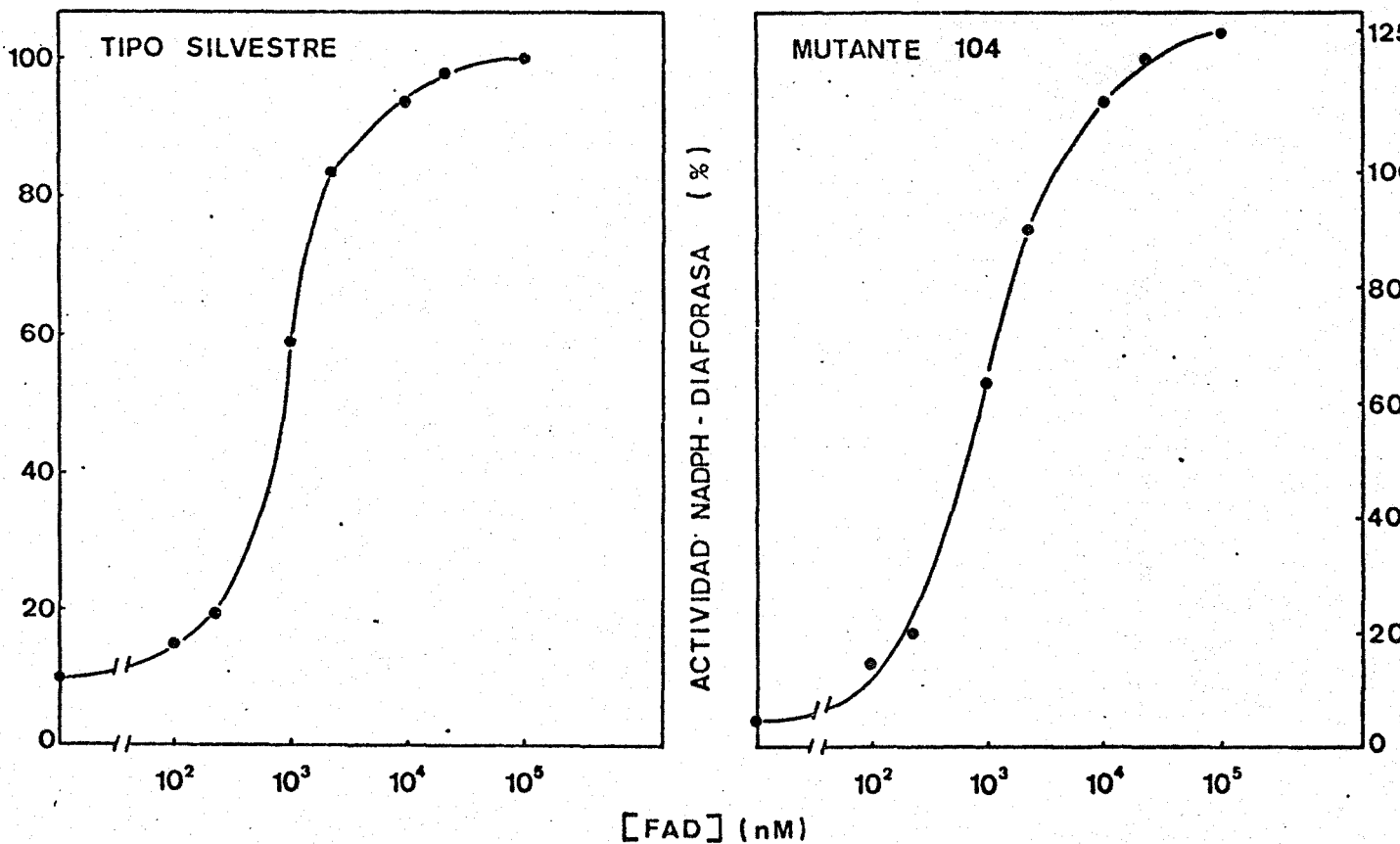


Fig. 16 Efecto de la concentración de FAD frente a la inactivación, por tratamiento, térmico, de la NADPH-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 15, excepto que la actividad determinada fué la NADPH-diaforasa, y se usaron 0,2 mg de enzima del tipo silvestre y 0,25 mg del mutante 104. El 100% de actividad correspondiente al control sin calentar fué 12,5 mU para la NADPH-diaforasa del tipo silvestre y 16 mU para la del mutante.

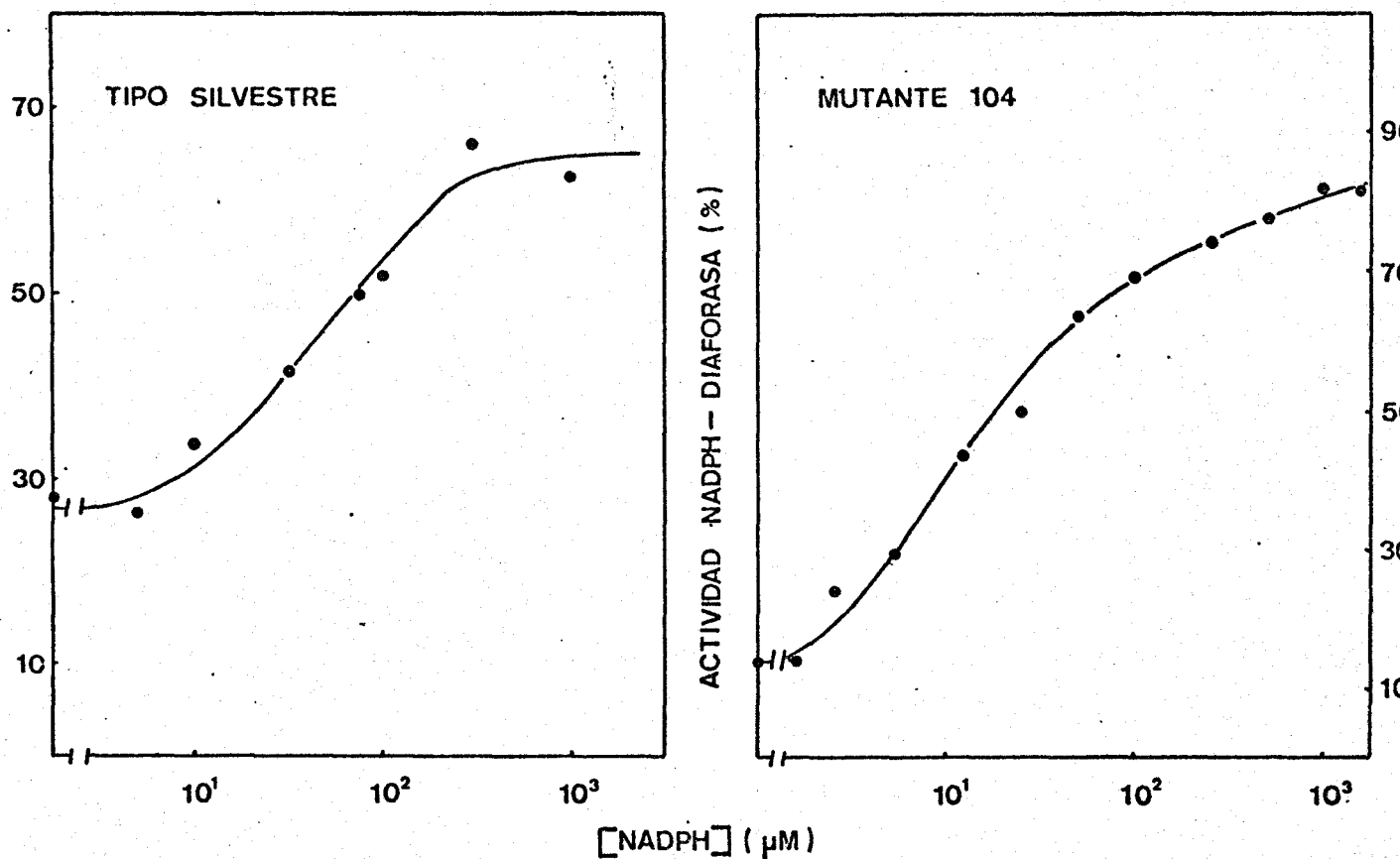


Fig. 17 Efecto protector del NADPH frente a la inactivación de la NADPH-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardtii*, por tratamiento con p-HMB. La nitrato reductasa del tipo silvestre (0,15 mg) o la diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas* (0,12 mg) se preincubaron en un volumen de 0,3 ml durante 2,5 min, a temperatura ambiente, con 25 µmoles de Tris-ClH, pH 7,5; 6 nmoles de p-HMB y las concentraciones de NADPH que se indican. Acabada la preincubación se completaron las mezclas hasta 3 ml con las cantidades correspondientes de reactivos del ensayo standard, y se determinó la actividad NADPH-diaforasa. El 100% de actividad correspondiente al control sin p-HMB fué 37 mU para la NADPH-diaforasa del tipo silvestre y 39 mU para la del mutante.

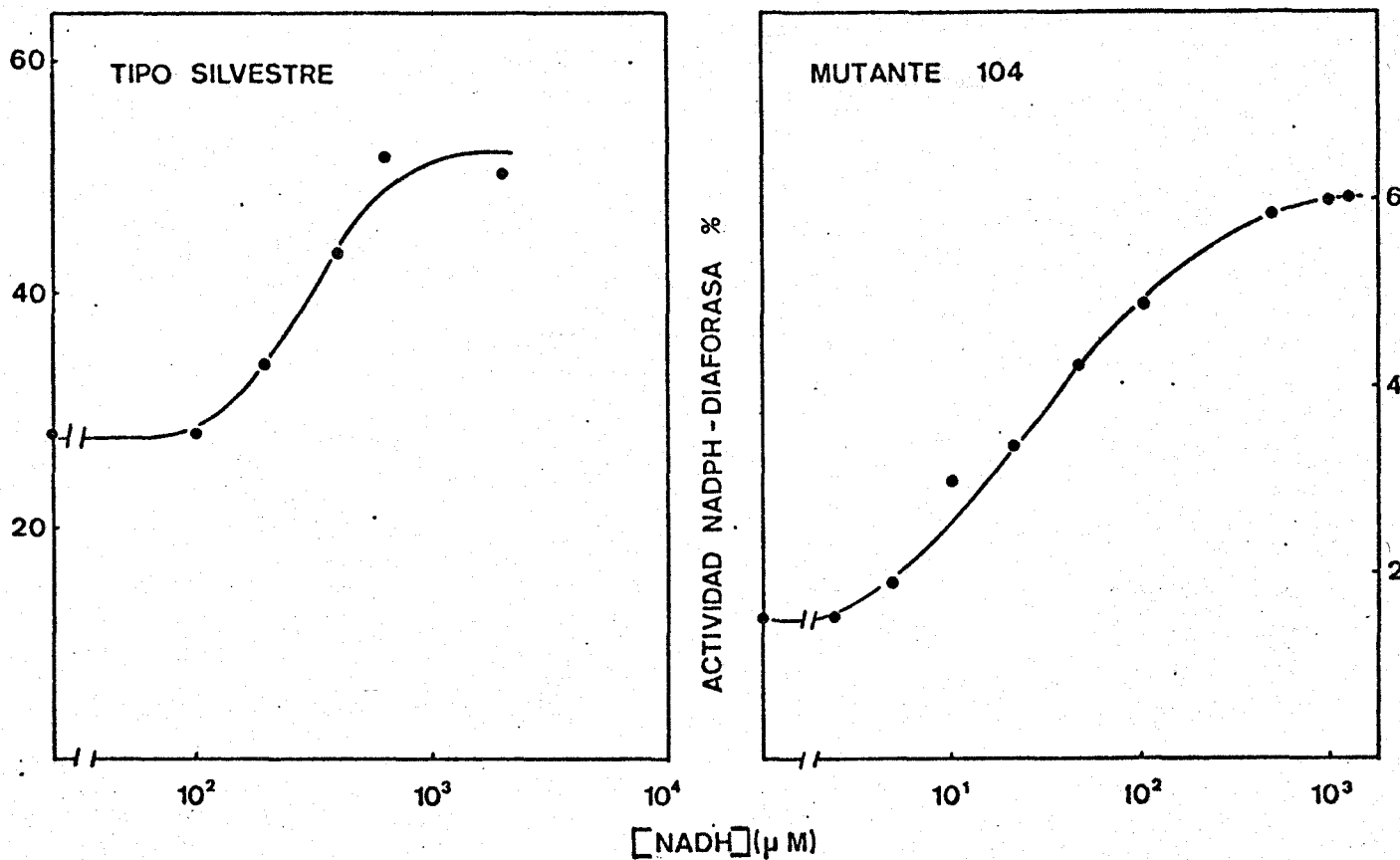


Fig. 18 Efecto protector del NADH frente la inactivación de la NADPH-diaforasa del tipo silvestre y mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardi*, por tratamiento con *p*-HMB. Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 17 excepto que se usó NADH a las concentraciones que se indican y se emplearon 0,15 mg de nitrato reductasa del tipo silvestre y 0,12 mg de diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas*. El 100% de actividad correspondiente al control sin tratar fué 37 mU para la NADPH-diaforasa del tipo silvestre y 27 mU para la del mutante.

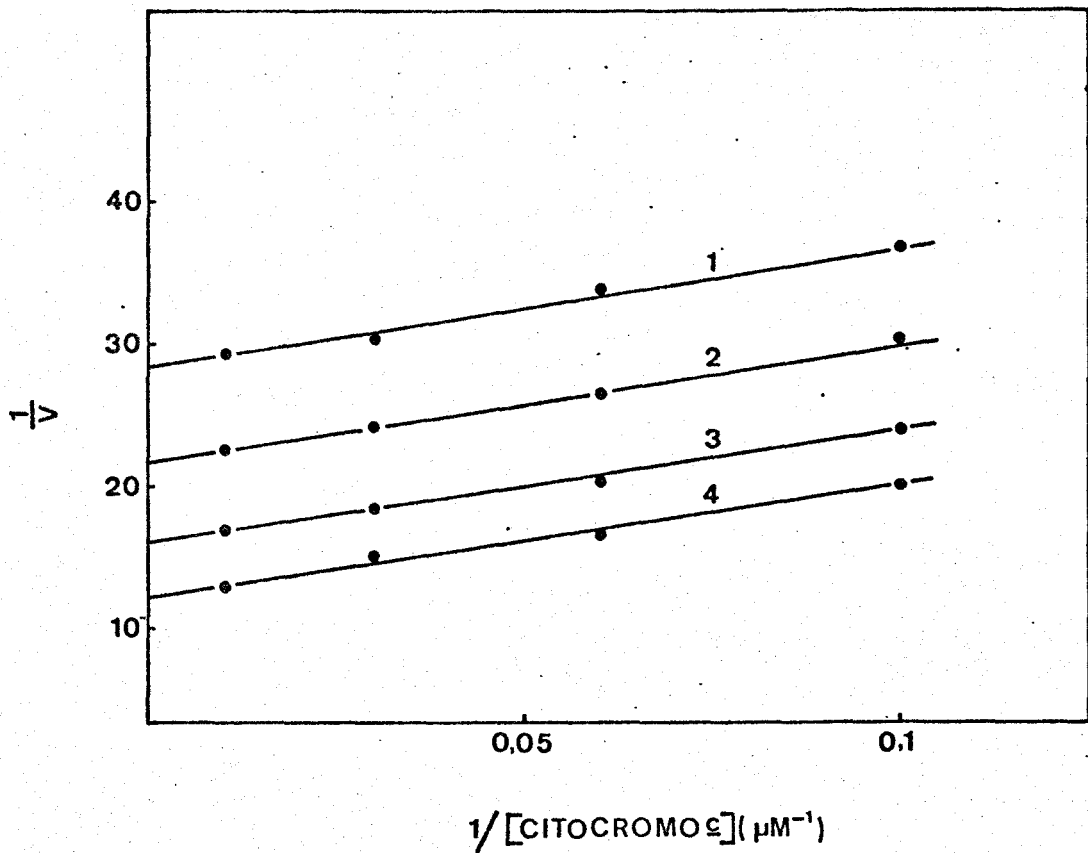


Fig. 19 Velocidades iniciales de reducción de citocromo c por NADH, catalizada por la diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas reinhardtii, a concentración de citocromo c oxidado variable. Los ensayos se hicieron con 0,3 mg de enzima, y citocromo c a las concentraciones que se indican, según se explica en Materiales y Métodos. La velocidad se expresa en unidades arbitrarias. Las concentraciones de NADH usadas fueron: 1 = 20 μM ; 2 = 33,33 μM ; 3 = 66,66 μM ; 4 = 200 μM .

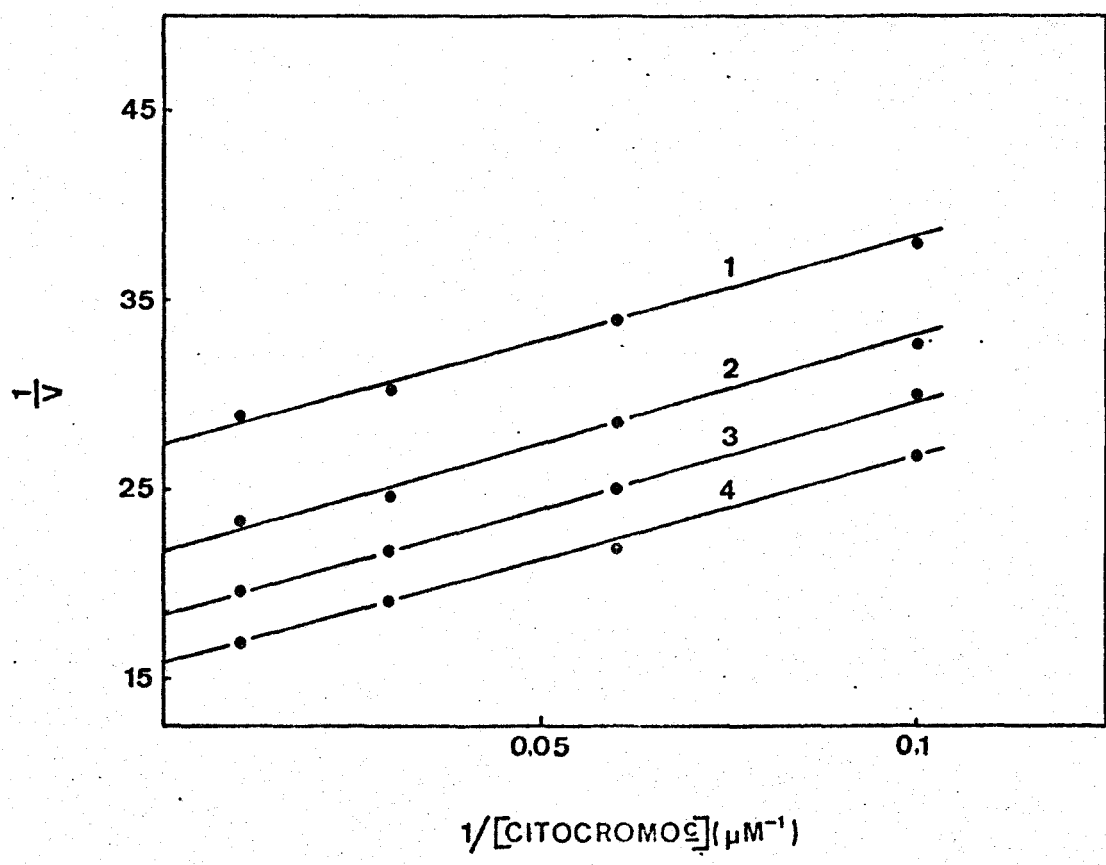


Fig. 20 Velocidades iniciales de reducción de citocromo c por NADPH, catalizada por la diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas reinhardi, a concentración de citocromo c oxidado variable. Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 19 Las concentraciones de NADPH usadas fueron: 1 = 10 μM ; 2 = 16,7 μM ; 3 = 33,33 μM ; 4 = 100 μM .

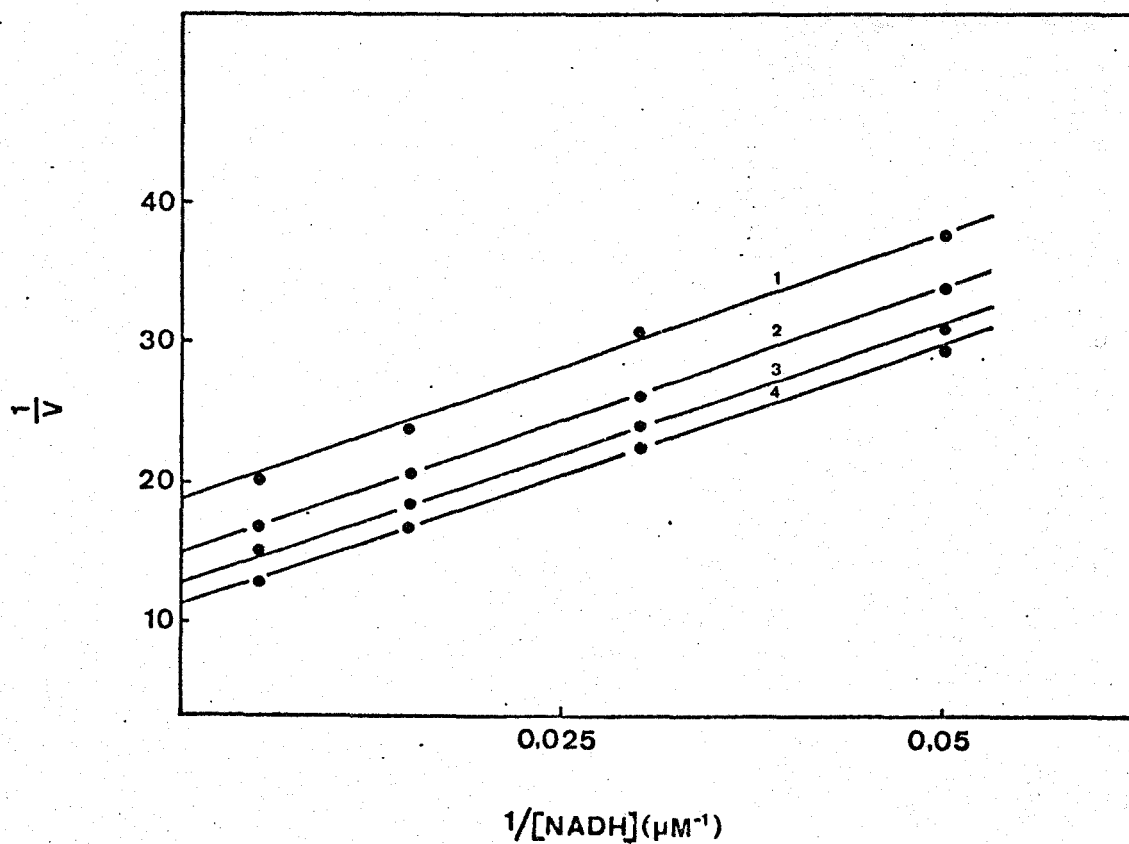


Fig. 21 Velocidades iniciales de reducción de citocromo c por NADH, catalizada por la diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardtii*, a concentración de NADH variable. Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 19 salvo que se usó NADH a las concentraciones que se indican. Las concentraciones de citocromo c oxidado fueron :
 1 = 10 μM ; 2 = 16,7 μM ; 3 = 33,33 μM ; 4 = 100 μM .

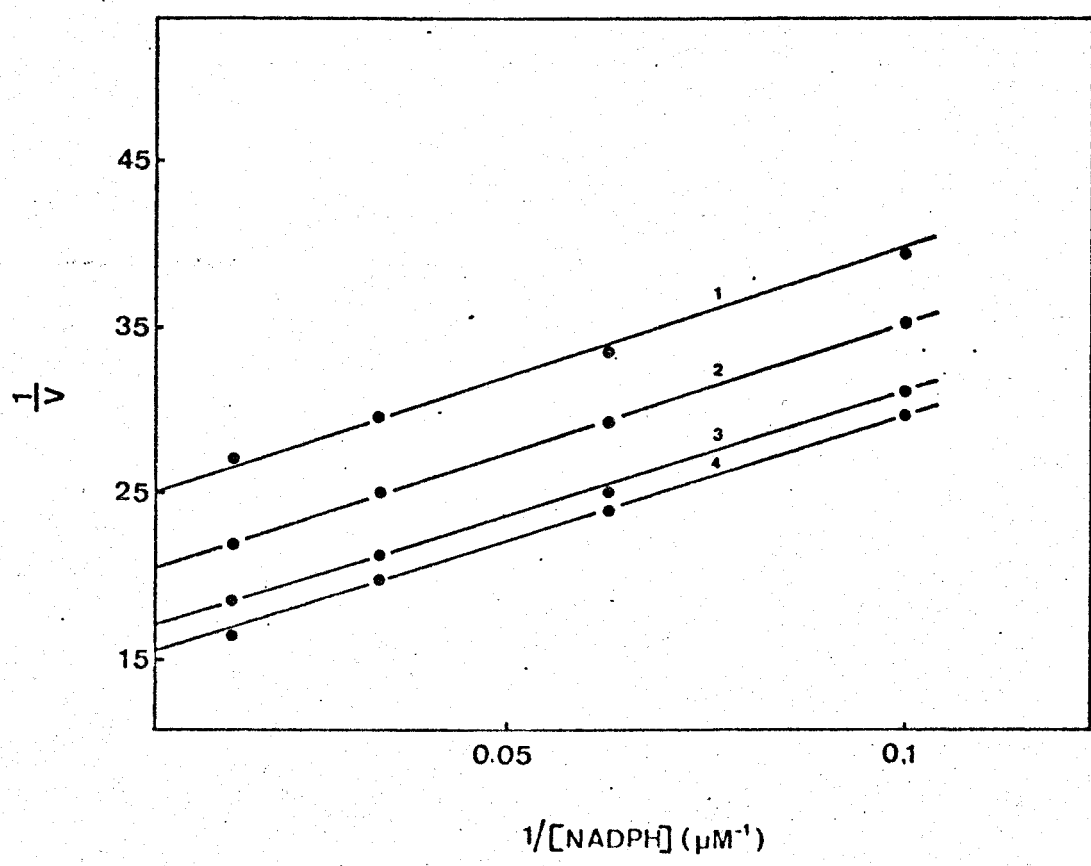


Fig. 22 Velocidades iniciales de reducción de citocromo c por NADPH, catalizada por la diaforasa del mutante 104 de Chlamydomonas reinhardi, a concentración de NADPH variable. Las condiciones experimentales son las mismas de la Fig. 19 salvo que se usó NADPH a las concentraciones que se indican. Las concentraciones de citocromo c oxidado usadas fueron: 1 = 10 µM; 2 = 16,7 µM; 3 = 33,33 µM; 4 = 100 µM.

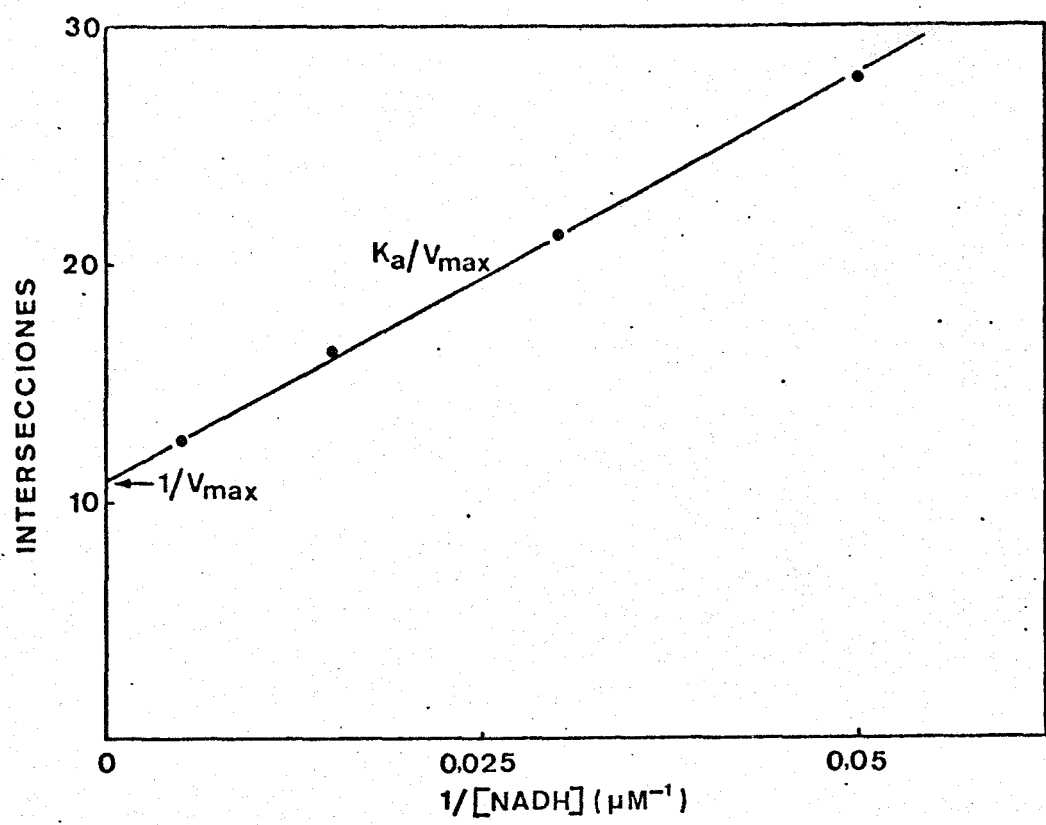


Fig. 23 Representación de las intersecciones de la Fig. 19 con respecto al inverso de la concentración de NADH (μM).

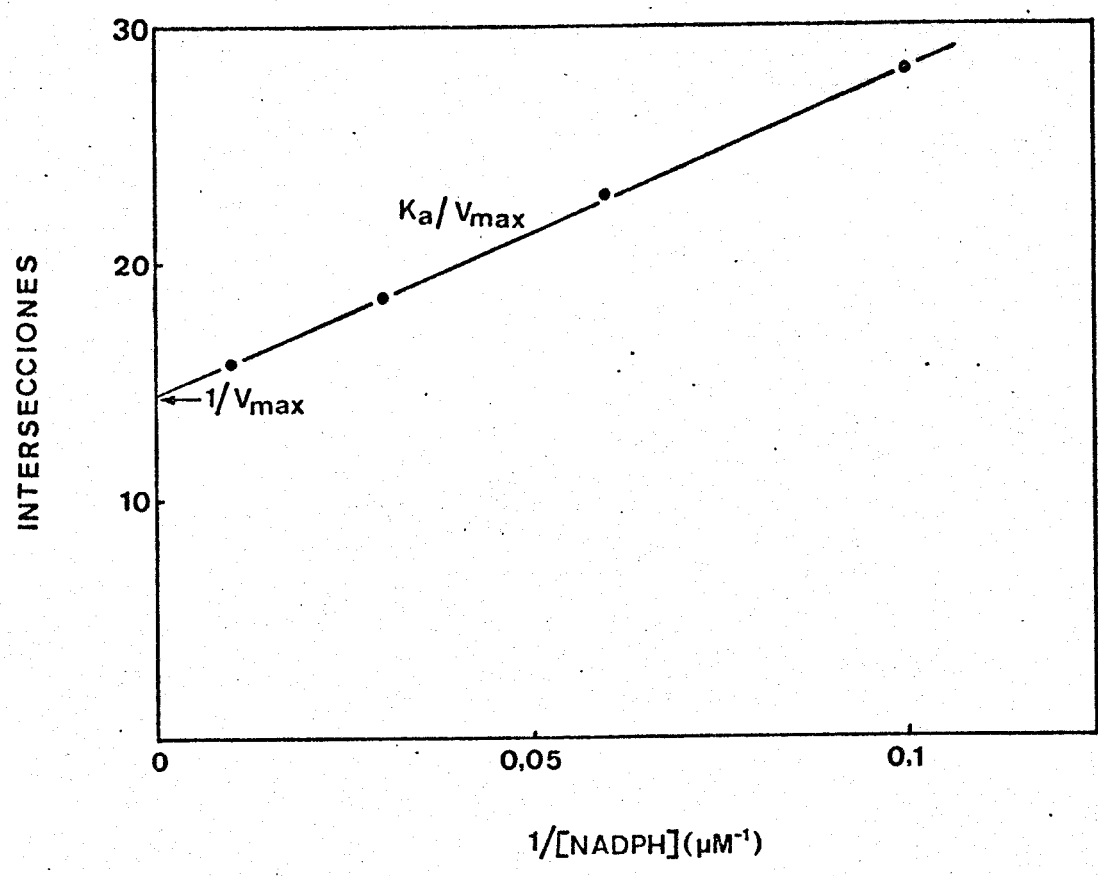


Fig. 24 Representación de las intersecciones de la Fig. 20 con respecto al inverso de la concentración de NADPH (μM).

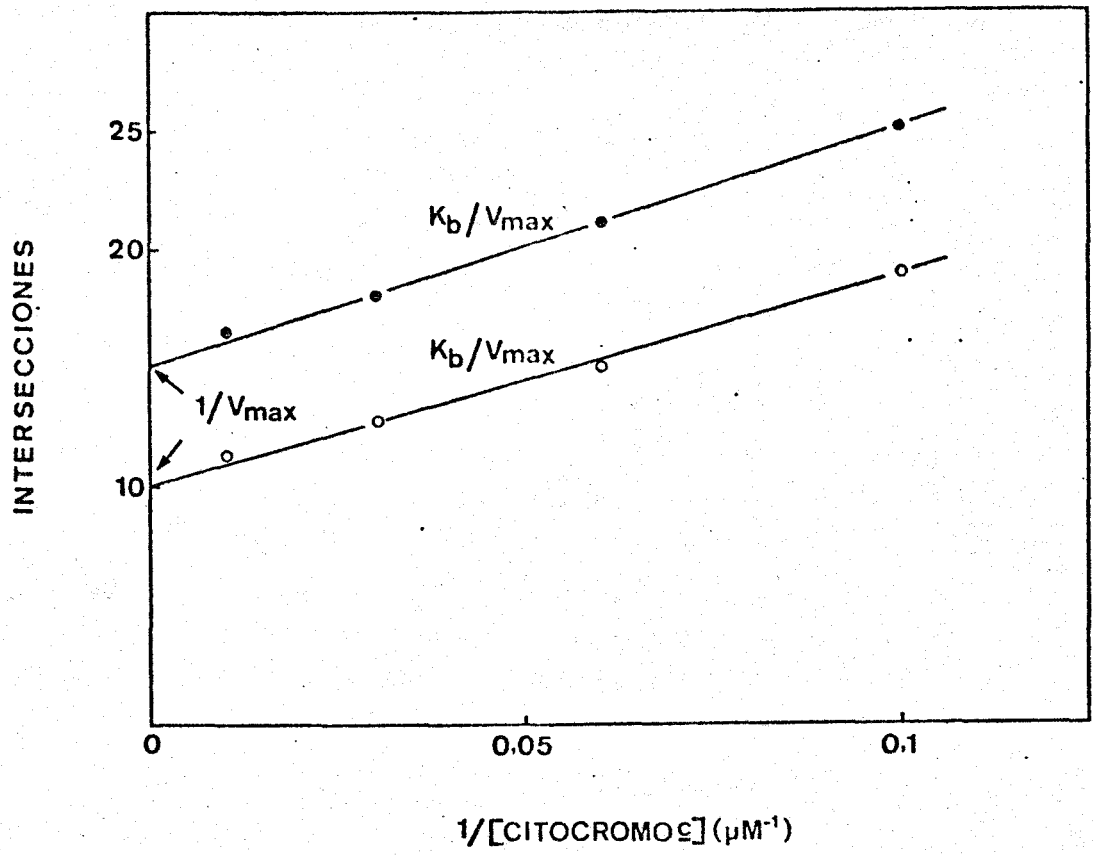


Fig. 25 Representación de las intersecciones de la Figs. 21 y 22 con respecto al inverso de la concentración de citocromo c oxidado (µM). O-O, NADH; ●-●, NADPH.

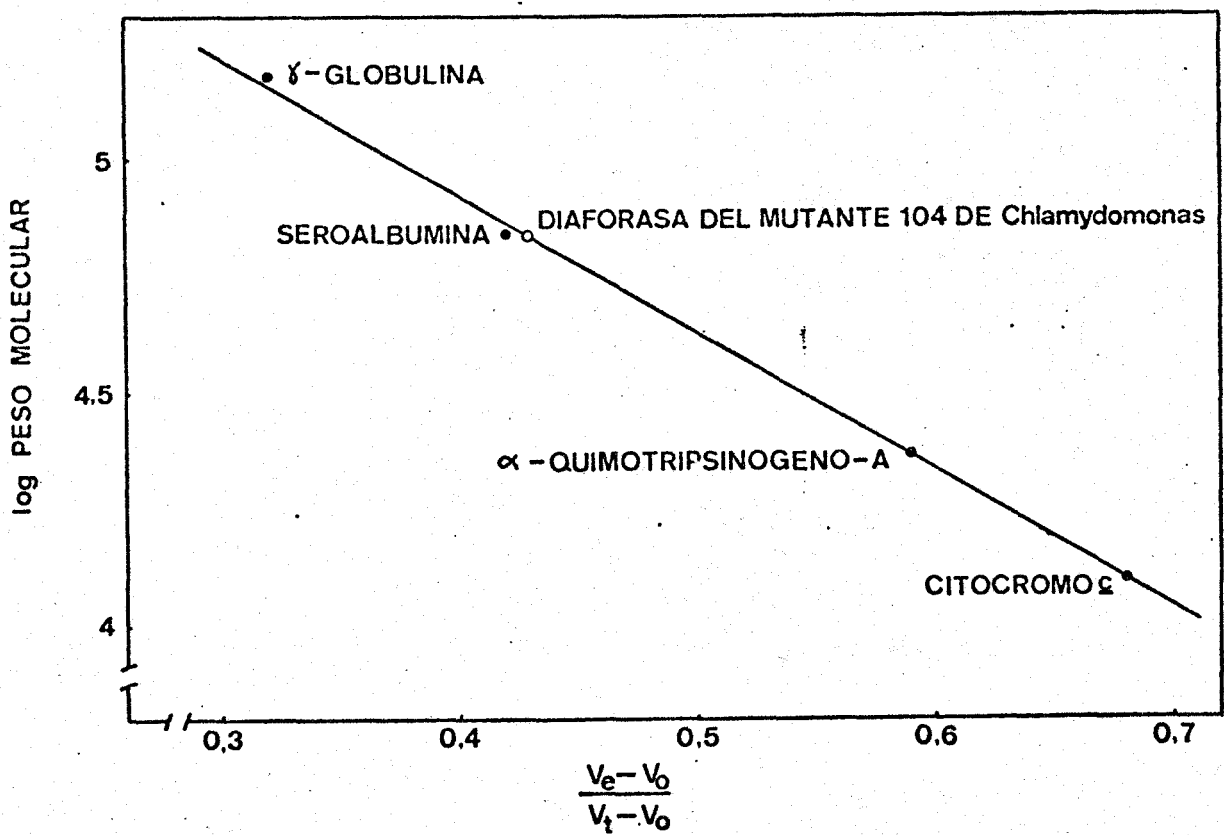


Fig. 26 Estimación del peso molecular de la diaforasa del mutante 104 de *Chlamydomonas reinhardi* por filtración en una columna de Agarosa. Las condiciones experimentales se encuentran detalladas en Materiales y Métodos.

V_e = Volumen de elución de las proteínas standard o del enzima

V_t = Volumen total de la columna

V_0 = Volumen vacío

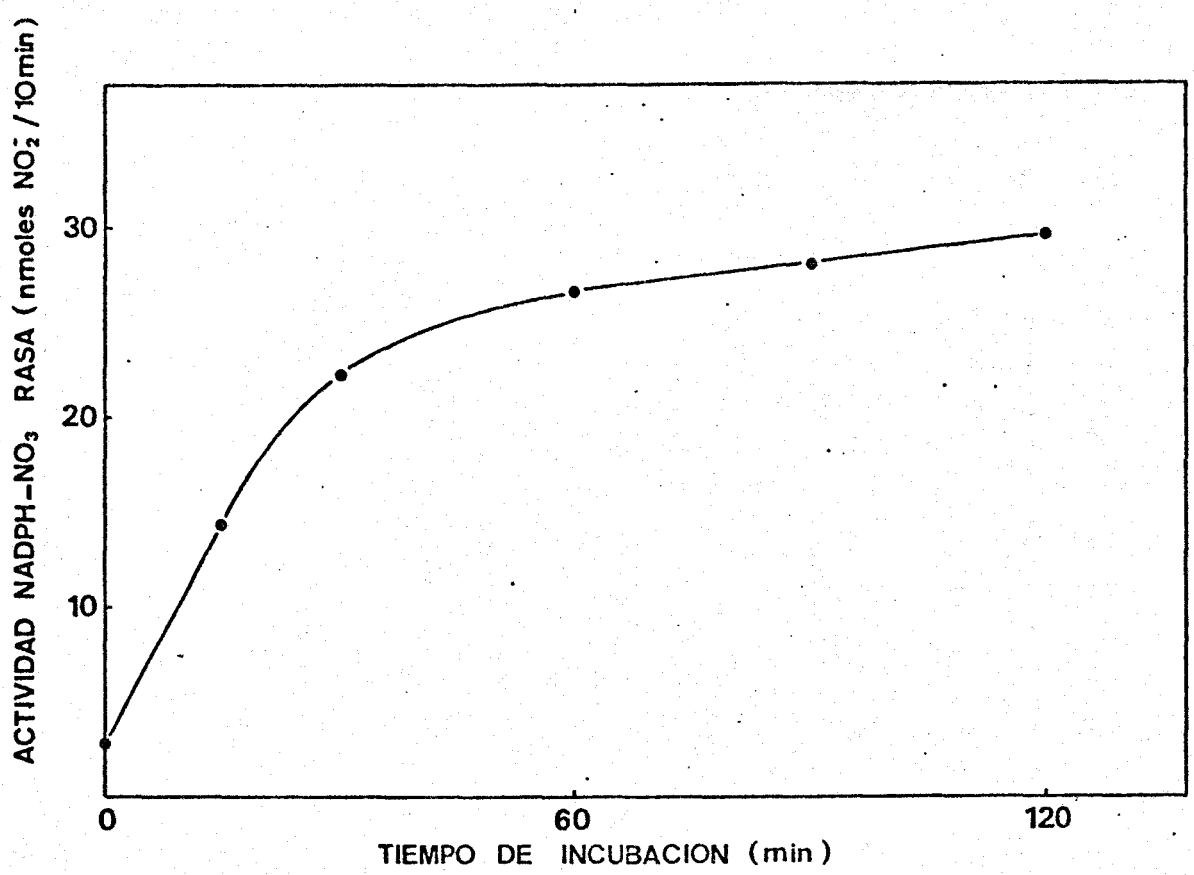


Fig. 27 *Cinética de complementación, a temperatura ambiente, entre extractos de nit-1 inducido y Chlamydomonas reinhardi, 6145 c cultivada en amonio. La mezcla para la complementación contenía 1 ml de extracto de nit-1 inducido (10,5 mg prot/ml) y 1 ml de extracto de tipo silvestre de Chlamydomonas reinhardi cultivado en amonio (3,3 mg prot/ml). A los tiempos indicados se ensayó la actividad con 0,2 ml de la mezcla, como se explica en Materiales y Métodos.*

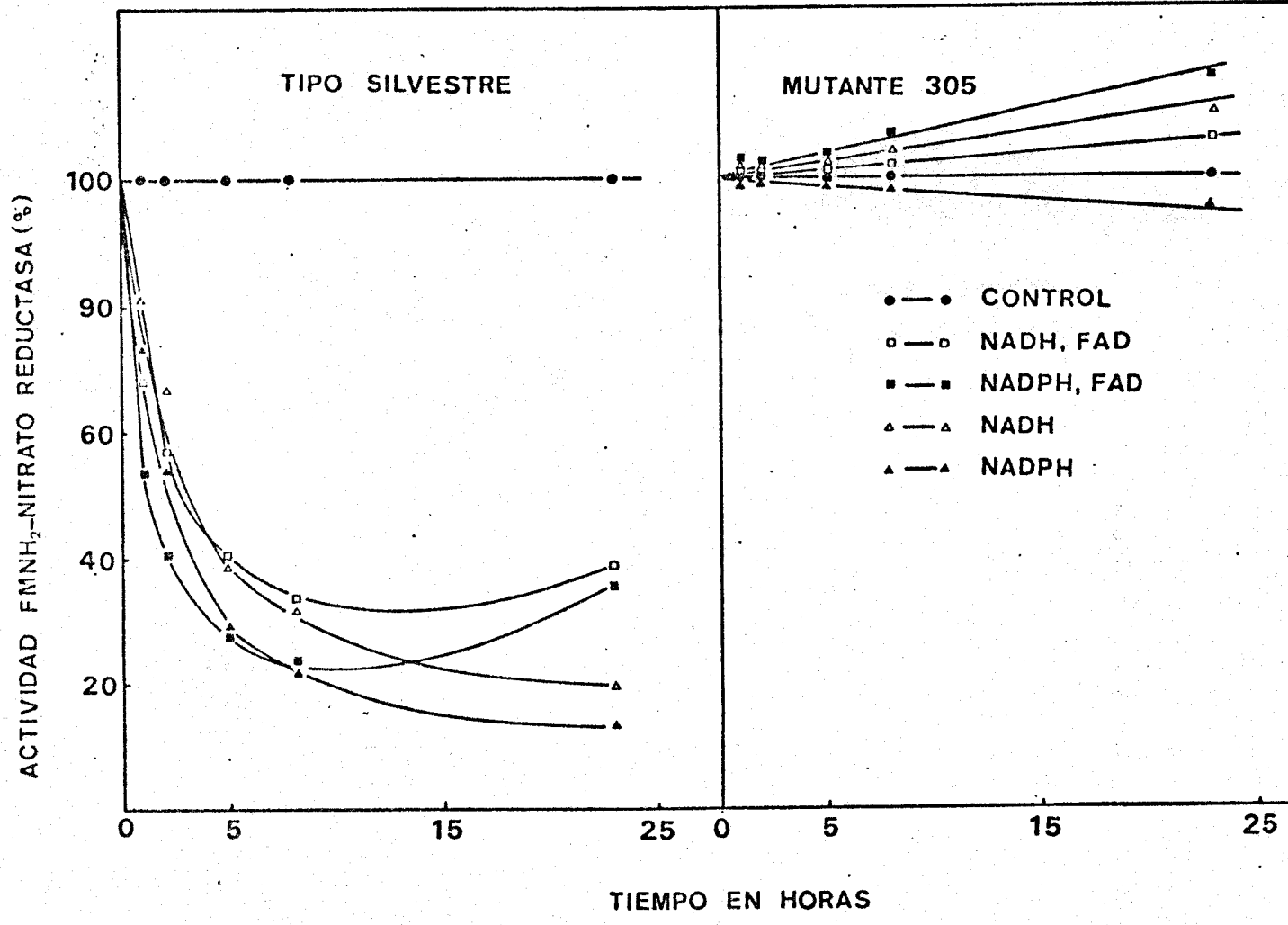


Fig. 28 Cinética de inactivación de la FMNH₂-nitrate reductasa del tipo silvestre y mutante 305 de *Chlamydomonas reinhardi*, por piridin nucleótidos reducidos. Las condiciones experimentales son las mismas de la Tabla XXVI, salvo que las preincubaciones se hicieron a 0°C, y que, a los tiempos indicados, se tomaron alícuotas en las que se realizó la actividad. El 100% de actividad correspondiente al control sin adiciones fué de 20 mU para el tipo silvestre y 25 mU para el mutante.

- 1 BEEVERS, L., HAGEMAN, R.H., Annu. Rev. Plant. Physiol., 20, 495-522 (1969)
- 2 HAGEMAN, R.H., HUCKLESBY, D.P., Methods in Enzymology, vol. 23 A, San Pietro, p. 491-503, New York, Academic Press(1971)
- 3 HEWITT, E.J., Annu. Rev. Plant. Physiol., 26, 73-100 (1975)
- 4 LOSADA, M., J. Mol. Cat., 1, 245-264 (1976)
- 5 LOSADA, M., La Fotosíntesis del nitrógeno nítrico, Real Academia de Ciencias, Madrid (1972)
- 6 SOLOMONSON, L.P., LORIMER, G.H., HALL, R.L., BORCHERS, R., LEGGETT, J., J. Biol. Chem., 250, 4120-4127 (1975)
- 7 PUIG, J., AZOULAY, E., PICHINOTY, F., C.R. Acad. Sci., Paris, 264, 1507-1509 (1967)
- 8 PUIG, J., AZOULAY, E., C.R. Acad. Sci., Paris, 264, 1916-1918 (1967)
- 9 ADAHYA, S., CLEARY, P., CAMPBELL, A., Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A., 61, 956-962 (1968)
- 10 PUIG, J., AZOULAY, E., GENDRE, J., RICHARD, E., C.R. Acad. Sci., Paris, 268, 183-184 (1969)

11 PUIG, J., AZOULAY, E., PICHINOTY, F., GENDRE, J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 659-662 (1969)

12 CASSE, F., Biochem. Biophys. Res. Commun., 39, 429-436 (1970)

13 GLASER, J.H., DE MOSS, J.A., J. Bacteriol., 108, 854-860, (1971)

14 GLASER, J.H., DE MOSS, J.A., Mol. Gen. Genet., 116, 1-10, (1972)

15 TAYLOR, A.L., TROTTER, C.D., Bacteriol. Rev., 36, 504-524 (1972)

16 MACGREGOR, C.H., SCHNAITMAN, C.A., J. Bacteriol., 112, 388-392 (1972)

17 ENOCH, H.G., LESTER, R.L., J. Biol. Chem., 250, 6693-6705 (1975)

18 MACGREGOR, C.H., J. Bacteriol., 121, 1117-1121 (1975)

19 STEVENS, S.E., VAN BAALEN, C., Arch. Mikrobiol., 72, 1-8 (1970)

20 STEVENS, S.E., VAN BAALEN, C., Plant. Physiol., 51, 350-356 (1973)

21 BAREA, J.L., Reducción asimilativa de nitrato : estructura y regulación de la nitrato y nitrito reductasas. Genética Microbiana. Editorial Alhambra (en prensa)

22 SILVER, W., McELROY, W.D., Arch. Biochem. Biophys., 51, 379-394 (1954)

23 SORGER, G.J., Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 395-401 (1963)

24 SORGER, G.J., Nature, 204, 575-576 (1964)

25 SORGER, G.J., GILES, N.H., Genetics, 52, 777-788 (1965)

26 SORGER, G.J., Biochim. Biophys. Acta, 118, 484-494 (1966)

27 NASON, A., ANTOINE, A.D., KETCHUM, P.A., FRAZIER III, W.A., LEE, D.K., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 65, 137-144 (1970)

28 LEE, K.Y., PAN, S.S., ERICKSON, R., NASON, A., J.Biol. Chem., 249, 3941-3952 (1974)

29 PATEMAN, J.A., COVE, D.J., REVER, B.M., ROBERTS, D.B., Nature, 201, 58-60 (1964)

30 ARST, H.N., McDONALD, D.W., COVE, D.J., Mol. Gen. Genet., 108, 129-145 (1970)

31 McDONALD, D.W., COVE, D.J., CODDINGTON, A., Mol. Gen. Genet., 128, 187-199 (1974)

- 32 COVE, D.J., PATEMAN, J.A., Nature, 198, 262-263 (1963)
- 33 KETCHUM, P.A., DOWNEY, R.J., Biochim. Biophys. Acta, 385, 354-361 (1975)
- 34 McDONALD, D.W., COVE, D.J., Eur. J. Biochem., 47, 107-110 (1974)
- 35 BAREA, J.L., CARDENAS, J., Arch. Microbiol., 105, 21-25 (1975)
- 36 BAREA, J.L., MALDONADO, J.M., CARDENAS, J., Physiol. Plant. 36, 325-332 (1976)
- 37 BAREA, J.L., SOSA, F., CARDENAS, J., Z. Pflanzenphysiol. 79, 237-245 (1976)
- 38 ZUMFT, W.G., Ber. Dtsch. Bot. Ges., 53, 221-228 (1970)
- 39 ZUMFT, W.G., SPILLER, H., YEBOAH-SMITH, I., Planta (Berl.) 102, 228-236 (1972)
- 40 RIGANO, C., Arch. Mikrobiol., 76, 265-276 (1971)
- 41 GUERRERO, M.G., GUTIERREZ, M., (En preparación)
- 42 JOLLY, S.O., CAMPBELL, W.H., TOLBERT, N.E., Archiv. Biochem. Biophys., 174, 431-439 (1976)
- 43 CAMPBELL, W.H., Plant. Science Letters, 7, 239-247 (1976)

- 44 SHEN, T.-C., FUNKHOUSER, E.A., GUERRERO, M.G., *Plant. Physiol.*, 58, 292-294 (1976)
- 45 BAREA, J.L., Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla (1974)
- 46 KETCHUM, P.A., SWARIN, R.S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 52, 1450-1456 (1973)
- 47 KETCHUM, P.A., CAMBIER, H.Y., FRAZIER III, W.A., MADANSKY, C.H., NASON, A., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 66, 1016-1023 (1970)
- 48 NASON, A., LEE, K.I., PAN, S.S., KETCHUM, P.A., LAMBERTI, A., DE VRIES, J., *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, 68, 3242-3246 (1971)
- 49 GANELIN, V.L., L'VOV, N.P., SERGEEV, I.S., SHANOSHNIKOV, G.L., KRETOVICH, V.L., *Dokl. Nauk. SSSR Bioximiya*, 206, 1236-1238 (1972)
- 50 KETCHUM, P.A., SEVILLA, C.L., *J. Bacteriol.*, 116, 600-609 (1973)
- 51 ZUMFT, W.G., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 87, 135-143 (1974)
- 52 DUBORDIEU, M., ANDRADE, E., PUIG, J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 766-773 (1976)
- 53 LOSADA, M., HERRERA, J., MALDONADO, J.M., PANEQUE, A., *Plant. Sci. Letters*, 1, 31-37 (1973)

- 54 PALACIAN, E., DE LA ROSA, F.F., CASTILLO, F., GOMEZ-MORENO, C., Arch. Biochem. Biophys., 161, 441-447 (1974)
- 55 CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F., CALERO, F., PALACIAN, E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 69, 277-284 (1976)
- 56 SUEOKA, N., CHIANG, K.S., KATES, J.R., J. Mol. Biol., 25, 47-66 (1967)
- 57 HUTNER, S.H., PROVOSOLI, L., SCHATZ, A., HASKINS, C.P., Proc. Amer. Phil. Soc., 94, 152 (1950)
- 58 RYAN, F.J., BEADLE, G.W., TATUM, E.L., Am. J. Botany, 30, 784-799 (1943)
- 59 NICHOLAS, D.J.D., NASON, A., McELROY, W.D., J. Biol. Chem., 207, 341-351 (1954)
- 60 PANEQUE, A., LOSADA, M., Biochim. Biophys. Acta, 128, 202-204 (1966)
- 61 SNELL, E.D., SNELL, C.D., Colorimetric Methods of Analysis. D. Van Nostrand Company, Academic Press, New York, pág. 804 (1949)
- 62 PANEQUE, A., APARICIO, P.J., LOSADA, M., Agrochimica, XIII, 177-184 (1968)
- 63 APARICIO, P.J., PANEQUE, A., RODRIGUEZ-LOPEZ, M., LOSADA, M., Anales Aula Dei, 10, 744-753 (1969)

- 64 PANEQUE, A., DEL CAMPO, F.F., RAMIREZ, J.M., LOSADA, M.,
Biochim. Biophys. Acta, 109, 79-85 (1965)
- 65 RAMIREZ, J.M., DEL CAMPO, F.F., PANEQUE, A., LOSADA, M.,
Biochim. Biophys. Acta, 118, 58-71 (1966)
- 66 SORGER, G.J., Biochim. Biophys. Acta, 99, 234-245 (1965)
- 67 GARRET, R.M., NASON, A., J. Biol. Chem., 244, 2870-2882
(1969)
- 68 MARTIN, R.G., AMES, B.N., J. Biol. Chem., 236, 1372-1379
(1961)
- 69 ANDREWS, P., Biochem. J., 91, 222-233 (1964)
- 70 HYAMS, J., DAVIES, D.R., Mutation Res., 14, 381-389 (1972)
- 71 LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.,
J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)
- 72 WARBURG, O., CHRISTIAN, W., Biochem. Z., 310, 384 (1941)
- 73 MARCOT, J., AZOULAY, E., FEBS Letters, 13, 137-139 (1971)
- 74 COVE, D.J., Biochem. J., 127, 19 (1972)
- 75 HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L.,
LOSADA, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 996-1003
(1972)

76 CLELAND, W.W., The Enzymes, Tercera edición, ed. por Boyer P.D., vol. 2, pág. 1 (1970)

77 CLELAND, W.W., Biochim. Biophys. Acta, 67, 104 (1963)

78 CLELAND, W.W., Ann. Rev. Biochem., 36, 77-112 (1967)

79 LEVINE, R.P., Annu. Rev. Plant Physiol., 20, 523-540 (1969)

80 LEVINE, R.P., GOODENOUGH, V.W., Am. Rev. Genetics, 4, 397- (1970)

81 HYAMS, J., DAVIES, D.R., Mutation Res., 14, 381-389 (1972)

82 McVITTIE, A., J. Gen. Microbiol., 71, 525-540 (1972)

83 APARICIO, P.J., Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla (1971)

84 ZUMFT, W.G., APARICIO, P.J., PANEQUE, A., LOSADA, M., FEBS Letters, 9, 157-160 (1970)

85 RELIMPIO, A.M., APARICIO, P.J., PANEQUE, A., LOSADA, M., FEBS Letters, 17, 226-230 (1971)

86 HOLBROOK, J.J., STINSON, R.A., Biochem. J., 120, 289-297 (1970)

87 FRIEDICH, P., Biochim. Biophys. Acta, 99, 371-375 (1965)

- 88 LI, T.K., VALLEE, B.L., Biochem. Biophys. Res. Commun., 12, 44-49 (1963)
- 89 LI, T.K., VALLEE, B.L., Biochemistry, 4, 1195-1202 (1965)
- 90 EAGLESHAM, A.R.J., HEWITT, E.J., Biochem. Soc., 122, p. 18 (1971)
- 91 DE LA ROSA, F.F., Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla (1975)
- 92 PLOWMAN, K.M., Enzyme Kinetics, McGraw-Hill, p. 41 (1972)
- 93 CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F., PALACIAN, E., Biochem. Biophys. Res. Commun., 64, 546-552 (1975)

El Tribunal integrado por los abajo firmantes
en la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
Francisco M. Sese Sureda
titulada "Aislamiento y caracterización bioquímica
de mutantes de *Chlorella vulgaris* sembrados afectos
en su reproducción en ambientes acuáticos"
resolvió otorgarle la calificación de _____

SOBRESALIENTE CUM LAUDE

Sevilla, 13 de Diciembre 1976

El Vocal,

Presidente,

F. Pino Pérez

El Vocal,

El Secretario,

El Vocal,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672949