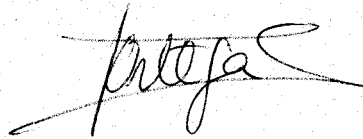


CARACTERIZACION Y REGULACION DE LA FOTORREDUCCION DE
NITRATO EN LA BACTERIA VERDE-AZULADA Nostoc muscorum.

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en
Ciencias por la Licenciada Trinidad Ortega Peralías

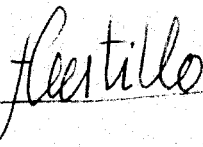


Sevilla, Noviembre de 1977

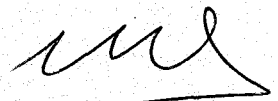
Director



Co-director



Catedrático ponente



Dr. Jacobo Cárdenas Dr. Francisco Castillo Prof. Manuel Losada

TD
577

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS
eV-xi-77
ENTRADA N.º 969



R. 18.565

A Antonio

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias y C.S.I.C. de la Universidad de Sevilla.

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Prof.D. Manuel Losada Villasante, y a los Doctores Jacobo Cárdenas Torres y Francisco Castillo Rodriguez, quienes con su dedicación constante me han orientado en la investigación científica y han hecho posible la realización de este trabajo.

Agradezco al Dr. Juan L. López Barea su estímulo y contribución al desarrollo de mi formación científica.

Asimismo, deseo manifestar mi agradecimiento al Dr. Joaquín Rivas Florido por su inapreciable colaboración en la realización de este trabajo.

A mis compañeros Francisco M. Sosa y Alicia Chapa - rro les agradezco su continua ayuda así como su labor de discusión y crítica y, a todos mis compañeros del Departamento les agradezco sinceramente su cotidiana colabora - ción.

Mi sincero agradecimiento a M^a José Pérez de León y Teresa Silva Cueto por su ayuda en la confección de este trabajo, así como a José Moreno Fernández por su colaboración técnica.

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

INDICE

ABREVIATURAS	1
I. INTRODUCCION	3
II. MATERIALES Y METODOS	11
A. CULTIVO DE CELULAS	12
A.1. Organismo empleado y condiciones de cul tivo	12
B. ENZIMAS	13
B.1. Obtención de partículas subcelulares... 13	
B.1.1. <i>Recolección de células</i>	13
B.1.2. <i>Preparación de extractos acelula res y partículas</i>	14
C. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS.... 16	
C.1. Actividad nitrato reductasa	16
C.2. Actividad NADP-reductasa	18
D. OBTENCION DE FERREDOXINA DE <u>Nostoc muscorum</u> . 19	
E. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS 19	
E.1. Determinaciones espectrofotométricas... 19	
E.2. Determinación de nitrito	19
E.3. Determinación de proteína	20
E.4. Determinación de clorofila	20
E.5. Determinación de ferredoxina	20
E.6. Determinación del desprendimiento de oxígeno	20
F. REACTIVOS Y APARATOS	21
F.1. Reactivos empleados	21
F.2. Aparatos utilizados	21

III. RESULTADOS	24
A. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUC	
TASA PARTICULADA DE <u>Nostoc muscorum</u>	25
A.1. Localización intracelular de la nitrato	
reductasa	25
A.2. Donadores de electrones y cofactores de	
la nitrato reductasa	25
A.3. Caracterización y propiedades de la MVH-	
nitrato reductasa	29
A.4. Solubilización y purificación parcial de	
la nitrato reductasa	35
A.5. Represión por amonio de la MVH-nitrato	
reductasa	37
A.6. Donador fisiológico de electrones de la	
nitrato reductasa	39
A.6.1. <i>Ferredoxina reducida en la oscuri</i>	
<i>dad</i>	39
A.6.2. <i>Ferredoxina reducida a la luz</i> ...	39
B. REDUCCION FOTOSINTETICA DE NITRATO POR PARTI-	
CULAS SUBCELULARES DE <u>Nostoc muscorum</u>	45
B.1. Fotorreducción de nitrato dependiente de	
ferredoxina con agua	45
B.2. Efecto del CMU en la fotorreducción de	
nitrato con agua	45
B.3. Efecto del pH sobre la fotorreducción de	
nitrato con agua	48
B.4. Estudio cinético de la fotorreducción de	
nitrato con agua	48

B.5. Proporcionalidad de la fotorreducción de nitrato con agua con la concentración de clorofila.....	48
B.6. Fotorreducción de nitrato a nitrito con agua acoplada al desprendimiento estequiométrico de oxígeno.....	48
C. REGULACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN PARTICULAS SUBCELULARES DE <u>Nostoc muscorum</u>	53
C.1. Interconversión por oxido-reducción de la MVH-nitrato reductasa.....	53
C.1.1. <i>Inactivación por ditionito de la MVH-nitrato reductasa y protección por diferentes compuestos frente a dicha inactivación....</i>	53
C.1.2. <i>Inactivación por reducción química con ditionito y reactivación por oxidación con ferric cianuro de la MVH-nitrato reductasa.....</i>	53
C.1.3. <i>Inactivación reversible de la MVH-nitrato reductasa por ferredoxina reducida en la oscuridad con NADPH y protección por nitrato.....</i>	56

C.1.4.	<i>Inactivación reversible de la MVH-nitrato reductasa por ferredoxina reducida a la luz con el par ascorbato/DPIP.....</i>	56
C.1.5.	<i>Caracterización de la inactivación por iluminación de la MVH-nitrato reductasa.....</i>	59
C.1.6.	<i>Reactivación por oxígeno de la MVH-nitrato reductasa previamente inactivada por reducción a la luz.....</i>	59
C.2.	<i>Papel del amonio en la regulación de la nitrato reductasa.....</i>	62
C.2.1.	<i>Efecto del amonio en la reducción de nitrato por distintos sistemas donadores de electrones.....</i>	62
C.2.2.	<i>Inhibición de la fotorreducción de nitrato por desacoplantes de la fotofosforilación.....</i>	62
C.2.3.	<i>Inhibición de la fotorreducción de nitrato por los sistemas ADP/Pi y amonio/ADP.....</i>	62
C.2.4.	<i>Inhibición por amonio de la fotorreducción de nitrato y del desprendimiento concomitante de oxígeno.....</i>	65

C.2.5. Efecto del amonio en la fotorre-	
ducción de nitrato y de NADP^+	69
C.2.6. Fotorreducción de ferricianuro en	
presencia y ausencia de amonio ..	69
C.2.7. Inhibición de la reducción foto-	
sintética de NADP^+ en presencia	
y ausencia de amonio.....	69
D. INTERCONVERSION METABOLICA DE LA FERREDOXINA	
NADP-REDUCTASA DE <u>Nostoc muscorum</u>	73
D.1. Inactivación de la ferredoxina-NADP re-	
ductasa por reducción por luz y NAD(P)H ..	73
D.2. Reactivación por oxidación con NADP^+ o fe	
rricianuro de la NADP-reductasa inactiva-	
da por NADPH	73
D.3. Protección de la ferredoxina-NADP reducta	
sa frente a la inactivación por NADPH ...	76
IV. DISCUSION	78
V. CONCLUSIONES	101
VI. BIBLIOGRAFIA.....	103

ABREVIATURAS

ADP	Adenosín-difosfato
BV	Bencil viológeno
CMU	3-(p-clorofenil) 1,1-dimetilurea
DEAE	Dietilaminoetil
DPIP	2,6-diclorofenolindofenol
EDTA	Acido etilen-diaminotetraacético
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
FeCy	Ferricianuro
FMN	Flavin mononucleótido
<u>g</u>	Aceleración de la gravedad
g	Gramos
K _c	Kilociclos
MV	Metil viológeno
MVH	Metil viológeno reducido
min	Minutos
NAD ⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H	NADH o NADPH indistintamente
NC ₃ Rasa	Nitrato reductasa

P _i	Fosfato inorgánico
P.M.	Peso molecular
seg	Segundos
Tricina	N-Tris(hidroximetil)metil glicina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

I INTRODUCCION

La nitrato reductasa asimilatoria, enzima que cataliza la reducción de nitrato a nitrito, ha sido estudiada en algas verdes, plantas superiores, bacterias fotosintéticas y organismos no fotosintéticos (8,20,25,35).

En plantas superiores, algas verdes y hongos, la nitrato reductasa es un complejo enzimático de alto peso molecular (250.000 - 500.000) sometido a regulación en su síntesis y actividad, que contiene hierro, molibdeno y flavina y utiliza piridín-nucleótidos reducidos como donadores fisiológicos de electrones (8,20,25,35). Dicho complejo consta de dos actividades enzimáticas que actúan secuencialmente en la transferencia de electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato: una actividad NAD(P)H-diaforasa, dependiente de FAD, transfiere los electrones donados por el NAD(P)H a una serie de aceptores artificiales (ferricianuro, DPIP, citocromo c, etc.) o bien a la segunda mitad del complejo, la nitrato reductasa terminal, una molibdo-proteína que lleva a cabo la inmediata reducción de nitrato a nitrito y que puede aceptar el poder reductor para este proceso, alternativamente, de ciertos donadores no fisiológicos como los viológenos y flavín nucleótidos reducidos químicamente (8,20,25,35).

En bacterias, la nitrato reductasa es un enzima de tamaño medio (P.M. 100.000) que contiene molibdeno y es dependiente de ferredoxina reducida como donador de electrones (12,18,21-23,42,44,63,65). Además puede recibir el poder reductor de viológenos reducidos mientras que los piridin-nucleótidos reducidos son ineficaces como donadores inmediatos de electrones. La nitrato reductasa de estos organismos carece por tanto de la actividad diaforasa típica de hongos, algas verdes y plantas superiores.

En la primera parte del presente trabajo se describe la caracterización enzimática de la nitrato reductasa particulada de la bacteria verde-azulada Nostoc muscorum.

El origen del poder reductor utilizado por los organismos fotosintéticos para reducir el nitrato se ha estudiado en plantas superiores, principalmente considerando la localización intracelular de la nitrato reductasa, problema aún no resuelto definitivamente y para cuya solución se han aportado resultados, hasta el presente, contradictorios (8).

Así, mientras algunos autores sugieren que la nitrato reductasa está localizada en los cloroplastos (13,49,52), posiblemente en la membrana de los mismos (53), otros con-

cluyen que este enzima se encuentra en el citoplasma celular, relacionándose, por tanto, sólo indirectamente con el proceso de la fotosíntesis (30,54). Incluso se la ha llegado a localizar en los peroxisomas proponiéndose que estos microsomas se unen a los cloroplastos cuando éstos son iluminados. (27,39,40).

En las bacterias verde-azuladas, la nitrato reductasa se encuentra asociada a la fracción particulada (partículas subcelulares) (7,10). La dependencia de estas partículas de ferredoxina para llevar a cabo la fotorreducción del nitrato con el fotosistema I (22,42) sugiere una estrecha conexión entre la reducción del nitrato y el proceso de la fotosíntesis en estos organismos procarióticos.

Por ello, en la segunda parte de este trabajo, se estudia en detalle la fotorreducción de nitrato por partículas subcelulares de la bacteria verde-azulada Nostoc muscorum, organismo que había sido descrito por Arnon y col. (3) como idóneo para estudio de fotosíntesis, estableciéndose las condiciones para el aislamiento de partículas capaces de reducir el nitrato a nitrito mediante la luz y agua y caracterizando los requerimientos de cofactores para llevar a cabo dicho proceso enzimático. De esta manera

se establecen sólidos puntos de partida para esclarecer el origen del poder reductor usado en la reducción de nitrato por las células fotosintéticas.

Parecida controversia existe respecto a la regulación de la nitrato reductasa de organismos fotosintéticos a nivel de síntesis. Tanto en plantas superiores y algas verdes como en bacterias verde-azuladas se ha defendido por diversos grupos que el nitrato es un inductor de la nitrato reductasa (8,29,45). Sin embargo, los resultados obtenidos por Syrett en Ankistrodesmus (62) y por el grupo de Sevilla en Chlorella, Chlamydomonas, y más recientemente en Anacystis parecen indicar abiertamente que el amonio, producto final de la reducción del nitrato operada por estos organismos, es más bien el represor nutricional de esta enzima (24,33,42).

Los resultados en Nostoc muscorum, incluidos en la tercera parte del presente trabajo, confirman el efecto represor del amonio sobre la nitrato reductasa.

Tras los trabajos pioneros del grupo de Sevilla sobre el carácter interconvertible por poder redox, tanto in vi-

vo como in vitro, de la nitrato reductasa de algas verdes y plantas superiores (24,33-36,41), se han descrito numerosos enzimas relacionados mediatamente con el proceso de fotosíntesis que pueden existir en forma activa e inactiva dependiendo del nivel redox intracelular (14,36). Estos resultados han confirmado con creces las predicciones formuladas por Losada (36) y suponen en términos generales una excelente confirmación de su hipótesis de un posible mecanismo del proceso de inactivación reversible de la nitrato reductasa en organismos fotosintéticos. Según esta hipótesis, el amoniaco, al producir un desacoplamiento de la fotofosforilación (19,32), generaría un aumento del poder reductor y ADP en la célula fotosintética, provocando en conjunto la inactivación del enzima. Este modelo de mecanismo ha sido confirmado recientemente al observarse un aumento intracelular en los niveles de piridín nucleótidos reducidos y adenín nucleótidos descargados concomitante con la inactivación por amonio de la nitrato reductasa de Chlorella fusca (11). Por otra parte, el grupo de Berlin ha expresado serias reservas respecto a esta hipótesis y sugieren alternativamente que la inactivación reversible tiene lugar fisiológicamente mediante el poder reductor y cianuro que se puede formar a partir de precursores mediante vías metabólicas un tanto compli-

cadas, en el interior de la célula fotosintética (37,51,60).

La tercera parte del presente trabajo estudia también la regulación de la actividad nitrato reductasa de Nostoc muscorum usando sistemas subcelulares de dicha alga. Los resultados obtenidos permiten concluir que al igual que el enzima de algas verdes, la nitrato reductasa es interconvertible por óxido-reducción. Asimismo se estudia el efecto de amonio en la fotorreducción del nitrato obteniéndose resultados que ayudan a interpretar la inactivación observada por la adición de amonio a células de algas verdes crecidas en nitrato (24,33) y a elegir entre las alternativas actualmente propuestas para explicar la inactivación reversible de la nitrato reductasa de organismos fotosintéticos.

La ferredoxina NADP-reductasa, enzima de cloroplastos clave en el proceso de conversión de la energía luminosa en poder reductor utilizable, es una flavoproteína que cataliza la reducción de NADP^+ con ferredoxina reducida por el flujo de electrones generado en la fotosíntesis (56,58). El enzima de plantas superiores ha sido cristalizado (58) y, además de la actividad ferredoxina NADP-reductasa, posee una serie de actividades enzimáticas como NADPH-diafo-

rasa (6), transhidrogenasa (28) y hemoproteína reductasa (15). La reducción fotosintética de NADP^+ así como la propia ferredoxina-NADP reductasa han sido menos estudiadas en bacterias verde-azuladas. No obstante, los escasos resultados conocidos apuntan a una gran semejanza con el enzima de plantas superiores en su espectro de absorción y en varios parámetros cinéticos (61).

El presente trabajo concluye con un estudio de la caracterización de la actividad ferredoxina-NADP reductasa de N. muscorum poniendo especial énfasis en el sistema de regulación de este enzima.

Algunos de los resultados que se exponen a continuación han sido comunicados en varias publicaciones y Congresos Internacionales (10, 46-48).

II MATERIALES Y METODOS

A. CULTIVO DE CELULAS

A.1. Organismo empleado y condiciones de cultivo

En el presente trabajo se ha empleado la bacteria verde-azulada Nostoc muscorum, estirpe 7119 cedida por el Dr. D.I. Arnon (Depto. Plant Physiology, Berkeley, USA).

El medio de cultivo fue el mismo descrito por Arnon (3) y contenía por litro: $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,124 g; $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,015 g; $\text{PO}_4\text{HK}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$, 0,457 g; ClNa , 0,117 g; solución Fe-EDTA, 1 ml; solución de micronutrientes D_7 , 1 ml y NO_3K , 2 g.

La solución Fe-EDTA se preparó disolviendo 16 g de EDTA y 10,4 g de KOH en 186 ml de agua y mezclándose con una solución de hierro preparada disolviendo 13,7 g de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 364 ml de agua. A continuación se burbujeó aire durante toda la noche para oxidar el hierro.

La solución D_7 contenía por litro: BO_3H . 2,86 g; $\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1,81 g; $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,222 g; $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,079 g; $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,26 g; VO_3Na , 0,239 g y $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,0403 g.

Las algas se cultivaron a temperatura ambiente, con iluminación continua de 3.000 lux suministrada por tubos fluorescentes de luz blanca, en frascos de Roux de 1 litro por los que se hizo pasar borboteando una corriente de aire enriquecida con un 2% (v/v) de CO_2 . Cuando se sustituyó el nitrato por otra fuente de nitrógeno, las células se cultivaron en tubos de 200 ml y la concentración de los compuestos nitrogenados fueron las que se indican en cada caso, siempre en base de nitrógeno. Cuando se utilizó nitrito se cuidó no sobrepasar la concentración 2 mM, debido a su efecto tóxico (31), mediante adiciones periódicas después de realizar el correspondiente análisis de la concentración remanente en el medio de cultivo. Cuando el $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ fué utilizado como fuente nitrogenada, la concentración de PO_4HK_2 en el medio se incrementó hasta 10 mM con objeto de mantener el pH óptimo de crecimiento.

B. ENZIMAS

B.1. Obtención de partículas subcelulares

B.1.1. *Recolección de células*

Cuando se partió de un volumen grande de medio de cultivo, las células se recogieron por centrifugación a 23.000 x g

en una centrifuga con sistema de flujo continuo. Cuando se parti6 de vol6menes peque1os, la centrifugaci6n se hizo en botes de 250 ml a 3.000 x g durante 10 min.

Para la preparaci6n de los sistemas particulados A y B, las c6lulas recolectadas se lavaron con tamp6n Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, antes de proceder a su rotura.

Para los sistemas particulados B y C, las c6lulas se lavaron con tamp6n Tricina-KOH 50 mM, pH 7,7, conteniendo sacarosa 0,5 M y Cl₂Mg 10 mM, antes de ser sometidas a sonica -
ci6n.

En ambos casos, las c6lulas resuspendidas en el tamp6n de lavado se pasaron a tubos de centrifugas de 50 ml, centrifug6ndose a continuaci6n a 27.000 x g durante 10 min.

B.1.2. *Preparaci6n de extractos acelulares y part6culas*

a) Sistema particulado A

Las c6lulas lavadas como se indica en B.1.1. se congelaron a -20°C, descongel6ndose a continuaci6n en presencia de Tris-ClH 10 mM, pH 7,7, en la proporci6n de 5 ml de tamp6n por cada gramo de peso h6medo de c6lulas. La sus -
pensi6n de c6lulas se mantuvo durante 2 horas a temperatu-

ra ambiente, con agitación continua, en presencia de lisozima (4 g de lisozima/g de peso húmedo de células). El homogenado obtenido se centrifugó a 3.000 x g durante 5 min. El sobrenadante de esta centrifugación constituyó el extracto acelular.

El extracto anterior se centrifugó a 40.000 x g durante 15 min y el sedimento, resuspendido en Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, constituyó el sistema particulado A usado en los experimentos que se describen en su lugar correspondiente.

b) Sistemas particulados B, B', C

Para la obtención del sistema particulado B, las células lavadas se resuspendieron en Tricina-KOH 50 mM, pH 7,7, conteniendo sacarosa 0,5 M y Cl_2Mg 10 mM. En el caso del sistema particulado B' el tampón utilizado fue Tris-ClH 50 mM, pH 7,5. Seguidamente, las células se rompieron por sonicación (20 Kc, 70 W) durante 40 segundos y el material roto se centrifugó a continuación a 3.000 x g durante 10 min. El sobrenadante de esta centrifugación constituyó un extracto acelular que se centrifugó posteriormente a 40.000 x g durante 20 min, descartándose el sobrenadante. El sedimento resultante resuspendido en Tricina-KOH 50 mM, pH 7,7, con sacarosa 0,5 M, y Cl_2Mg 10 mM, constituyó el sistema particulado

B usado en experimento de fotosíntesis y, resuspendido en Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, el sistema particulado B'.

Para la obtención del sistema particulado C, las células se prepararon y rompieron como en el caso del sistema B descrito anteriormente. El sedimento obtenido tras centrifugar las células rotas a 3.000 x g se resuspendió en tampón Tricina-KOH 50 mM, pH 7,7, conteniendo sacarosa 0,5 M y Cl_2Mg 10 mM, y se sometió a una segunda sonicación en las mismas condiciones. A continuación, el material roto se centrifugó a 3.000 x g durante 10 min, y el sobrenadante resultante, a 40.000 x g durante 20 min. El sedimento obtenido, resuspendido en Tricina-KOH 50 mM, pH 7,7, con sacarosa 0,5 M y Cl_2Mg 10 mM, constituyó el sistema particulado C usado en experimentos de fotorreducción de nitrato con evolución concomitante de oxígeno.

Todas las operaciones que se indican en este apartado se realizaron a 0°C.

C. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

C.1. Actividad nitrato reductasa

La actividad enzimática de reducción de nitrato se de-

terminó aeróbicamente siguiendo colorimétricamente el nitrito formado (cfr. E.2), y utilizando distintos sistemas donadores de electrones.

Para el ensayo standard de la actividad nitrato reductasa se utilizó como donador de electrones metil-viológeno reducido químicamente con ditionito, siguiéndose la reacción a 30°C durante 5 a 7 min. La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 1 ml, además del enzima, 100 μ moles de Glicina-KOH, pH 7,5; 40 μ moles de NO_3K ; 1,6 μ moles de MV y 8 μ moles de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ disueltos en 0,1 ml de CO_3HNa 150 mM. La reacción se terminó por agitación vigorosa hasta la oxidación completa del ditionito.

La actividad NADPH- NO_3 Rasa se determinó en las condiciones descritas en cada caso. Con objeto de eliminar la interferencia del NADPH en la determinación colorimétrica del nitrito formado, se añadió, al final de la reacción enzimática, ferricianuro 20 mM y se mantuvo la mezcla 2 min a 30°C. Seguidamente se añadieron los reactivos de diazotación usados en la determinación de nitrito como se describe a continuación (cfr. E.2).

Las actividades de fotorreducción de nitrato se midieron en las condiciones experimentales que se indican en cada caso. En todos los casos la iluminación fué de 20.000 lux.

C.2. Actividad NADP-reductasa

La actividad NADP-reductasa se midió espectrofotométricamente por la reducción de citocromo c como aceptor, en presencia de ferredoxina y NADPH como donador (59), siguiendo el incremento de absorbancia a 550 nm. La mezcla de ensayo contenía, en un volumen final de 1 ml, además de la preparación enzimática, 100 μ moles de Tris-ClH, pH 8,0; 0,12 μ moles de citocromo c; 0,1 mg de ferredoxina de Nostoc y 0,5 μ moles de NADPH.

La actividad de reducción fotosintética de NADP^+ se determinó al aire, en las condiciones de ensayo que se indican en los correspondientes experimentos, con una iluminación de 20.000 lux.

Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima capaz de transformar un μ mol de sustrato en un minuto a 30°C. La actividad específica se expresa en unidades de enzima por miligramo de proteína.

D. OBTENCION DE FERREDOXINA DE Nostoc muscorum

La ferredoxina se obtuvo parcialmente purificada siguiendo el método descrito por Mitsui y Arnon (43).

E. TECNICAS EXPERIMENTALES Y METODOS ANALITICOS

E.1. Determinaciones espectrofotométricas

El piridín nucleótido reducido se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de la solución a 340 nm. Para los cálculos se usó un coeficiente de extinción molar, $E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ M}} = 6.200$.

El citocromo c reducido se valoró espectrofotométricamente a 550 nm, considerando a esa longitud de onda un coeficiente de extinción molar, $E_{1 \text{ cm}}^{1 \text{ M}} = 28.000$.

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

E.2. Determinación de nitrito

El nitrito se determinó espectrofotométricamente, por

el producto coloreado formado en la reacción de diazotación de Gries-Ilosway, según la técnica propuesta por Snell y Snell (57).

E.3. Determinación de proteína

Se siguió el método de Lowry y col. (38) utilizando ovoalbúmina como patrón.

E.4. Determinación de clorofila

La concentración de clorofila en las partículas fotosintéticas se determinó por su absorbancia a 652 nm, después de extraer con acetona al 80%, según el método descrito por Arnon (1) considerando que el coeficiente de extinción ($E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}}$) de la clorofila a esta longitud de onda es de 34,5.

E.5. Determinación de ferredoxina

La ferredoxina se determinó por su absorción a 423 nm considerando un coeficiente de extinción $E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}}$ de 0,65

E.6. Determinación del desprendimiento de oxígeno

El desprendimiento de oxígeno se midió en un electrodo de oxígeno tipo Clark.

F. REACTIVOS Y APARATOS

F.1. Reactivos empleados

Los siguientes compuestos: NADH, NAD⁺, NADPH, NADP⁺, ADP, FAD, FMN, Citocromo c, Tris, Tricina, DEAE-celulosa fueron adquiridos a SIGMA, San Luis, USA. El MV, BV, CMU, procedían de SERVA, Heidelberg, Alemania y MANN, New York, USA. El resto de los compuestos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron a PHARMACIA, Uppsala, Suecia; MERCK, Darmstad, Alemania; RIEDEL, Hannover, Alemania; BDH, Poole, Inglaterra; CARLO ERBA, Milan, Italia. El agua destilada se obtuvo mediante un aparato destilador DRA. El CO₂ empleado en el cultivo de las células fue suministrado por COROMINA INDUSTRIAL, Sevilla.

F.2. Aparatos utilizados

La rotura de células por ultrasonidos se realizó con un sonicador Branson, modelo B-12, de 20 kciclos/seg.

Las centrifugaciones se hicieron en centrífugas refrigeradas Sorvall RC2-B y Beckman Spinco, modelo L2-50B; y en una centrífuga Sorvall modelo SS-1 con sistema de flujo continuo Szent-Gyorgy y Blum.

La filtración en gel de las preparaciones enzimáticas se hizo en columnas suministradas por PHARMACIA, Uppsala, Suecia.

Las fracciones se recogieron automáticamente empleando un colector de fracciones Ultrorac 7.000 de la casa LKB.

La diálisis se hizo en saquitos de celulosa suministrados por SIGMA, San Luis, USA.

Las determinaciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro Pye-Unicam, modelo SP 1800 con registro automático.

Las medidas colorimétricas se hicieron empleando colorímetros Spectronic 20 y 700 de la casa Bausch and Lomb.

Las medidas de desprendimiento de oxígeno se realizaron en un electrodo tipo Clark conectado a un registrador Servoscribe 1s.

Los ensayos a la luz se realizaron en el baño termostático de un aparato Warburg modelo Braun para fotosíntesis.

El pH se midió en un aparato de escala ampliada Metrohm-Herisau modelo E 512.

Para la agitación de soluciones en tubos de ensayo se utilizó un Super-Mixer de alta velocidad suministrado por Lab-Line Instruments, USA.

III RESULTADOS

A. CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA PARTICULADA DE Nostoc muscorum

A.1. Localización intracelular de la nitrato reductasa

Para localizar la nitrato reductasa se rompieron las células enzimáticamente con lisozima como se indica en Materiales y Métodos (cfr. B.1.2), con objeto de evitar la posible solubilización del enzima caso de estar unido a membranas. Como se observa en la Tabla I, prácticamente toda la actividad nitrato reductasa presente en el extracto acelular aparece unida a partículas.

A.2. Donadores de electrones y cofactores de la nitrato reductasa

A pH 10,5 sólo se detecta actividad con metil viológeno reducido químicamente con ditionito como donador de electrones. A pH 8,5 la nitrato reductasa es capaz de utilizar NADPH y NADH con menor eficiencia como donador de electrones aunque requiere metil viológeno como cofactor.

Respecto a otros donadores de electrones cabe destacar la prácticamente nula eficiencia de los flavín-nucleótidos y bencil-viológeno reducidos químicamente con ditionito

TABLA I

LOCALIZACION INTRACELULAR DE LA NITRATO REDUCTASA DE Nostoc muscorum

Fracción	Proteína (mg)	Actividad (mU)	Actividad específica (mU/mg proteína)
Extracto crudo	80	1.232	15,4
Sobrenadante, 40.000 x <u>g</u> , 15 min	40	36	0,9
Sedimento, 40.000 x <u>g</u> , 15 min	140	3.176	23,4

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de glicina-KOH, pH 10,5; 40 μ moles de NO_3K ; 1,6 μ moles de MV; 8 μ moles de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ disueltos en 0,1 ml de CO_2HNa 150 mM y cantidades adecuadas de las correspondientes fracciones enzimáticas obtenidas por tratamiento de las células con lisozima, según se indica en Materiales y Métodos.

TABLA II

DONADORES DE ELECTRONES Y COFACTORES DE LA NITRATO REDUCTASA
DE Nostoc ASOCIADA A PARTICULAS

Donadores y cofactores	Concentración (mM)	Nitrito formado (nmoles/10 min)	
		pH 8,5	pH 10,5
NADH	0,3	0	0
NADH; FAD	0,3; 0,02	0	0
NADH; FMN	0,3; 0,02	0	0
NADH; BV	0,3; 1,60	0	0
NADH; MV	0,3; 1,60	60	0
NADPH	0,3	0	0
NADPH; FAD	0,3; 0,02	0	0
NADPH; FMN	0,3; 0,02	0	0
NADPH; BV	0,3; 1,60	0	0
NADPH; MV	0,3; 1,60	182	0
$S_2O_4^{=}$; ferredoxina	8,0; 0,01	0	0
$S_2O_4^{=}$; FAD	8,0; 0,20	10	0
$S_2O_4^{=}$; FMN	8,0; 0,20	0	0
$S_2O_4^{=}$; BV	8,0; 1,60	20	0
$S_2O_4^{=}$; MV	8,0; 1,60	300	3270

La mezcla de ensayo contenía, en un volumen de 1 ml: 40 μ moles de NO_3K ; una alícuota de la fracción particulada A conteniendo 20 mg de proteína; según los casos, 100 μ moles de glicina-KOH, pH 10,5 ó de Tris-ClH, pH 8,5, y las correspondientes concentraciones de los distintos donadores y cofactores que se indican. Otras condiciones se indican en Materiales y Métodos.

mientras que el metil-viológeno reducido químicamente puede actuar como donador de electrones (Tabla II).

A.3. Caracterización y propiedades de la MVH-nitrato reductasa

Como puede observarse en los datos presentados en la Tabla III, la actividad MVH-nitrato reductasa asociada a partículas tiene un requerimiento absoluto de enzima, nitrato y donador de electrones. El ditionito en ausencia de transportador de electrones es incapaz de reducir el nitrato a nitrito.

Usando tampones de fosfato, Tris-ClH, glicina-KOH y carbonato se determinó el pH óptimo de esta actividad, resultando estar en la zona 10,5-11,0 (Fig. 1).

La actividad MVH-nitrato reductasa presenta un máximo para una concentración de MV 1,6 mM y de ditionito 8 mM (Fig. 2).

Usando diferentes concentraciones de proteína se observa una proporcionalidad entre ésta y la actividad MVH-nitrato reductasa (Fig. 3). Sin embargo, dicha actividad sólo es proporcional al tiempo de ensayo en los 8 primeros minutos (Fig. 4).

TABLA III

CARACTERIZACION DE LA REDUCCION DE NITRATO POR PARTICULAS DE
Nostoc muscorum CON METIL VIOLOGENO REDUCIDO QUIMICAMENTE
 CON DITIONITO

Sistema	Nitrito formado (nmoles/min)
Completo	135
menos ditionito	0
menos MV	0
menos partículas	0
menos nitrato	8

El sistema completo contenía, en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de glicina-KOH, pH 10,5; 40 μ moles de NO_3K ; 1,6 μ moles de MV; 8 μ moles de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ disueltos en 0,1 ml de CO_3HNa 150 mM y partículas A de N. muscorum conteniendo 2 mg de proteína.

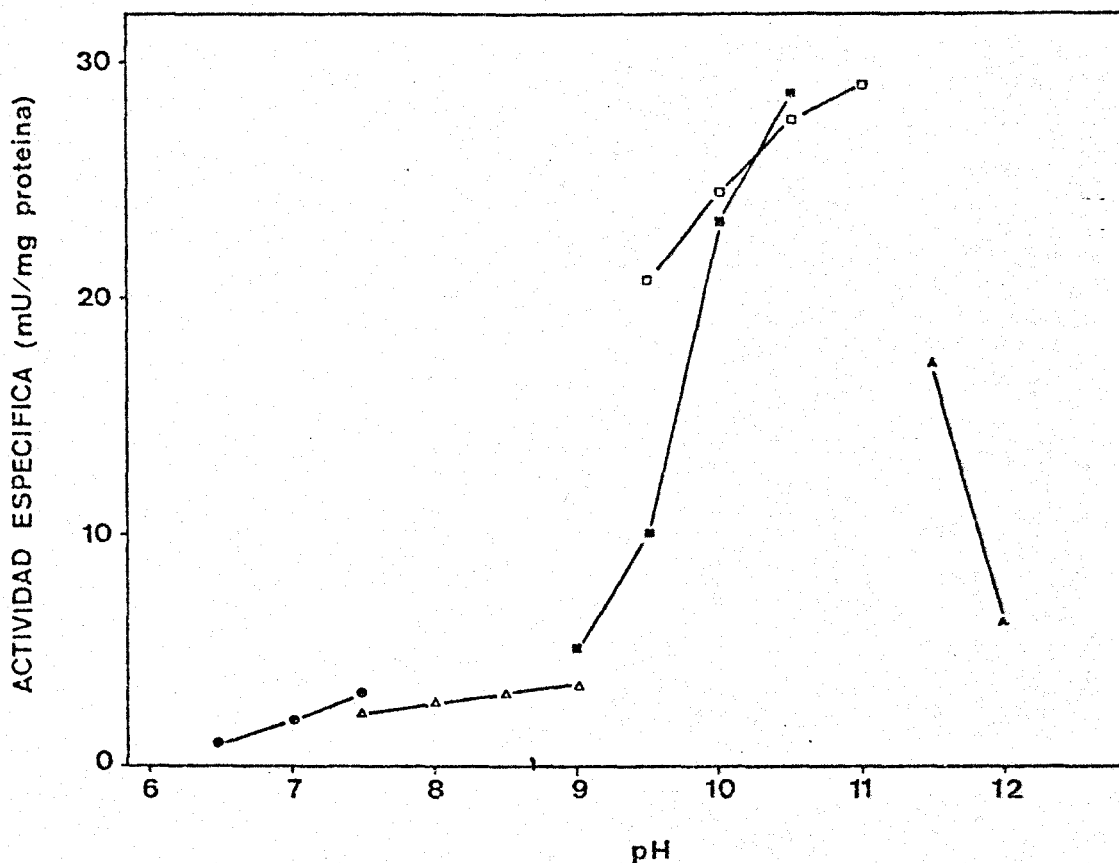


Fig. 1. Efecto del pH en la actividad MVH-nitrato reductasa de *Nostoc muscorum*. Las condiciones experimentales fueron como las descritas en la Tabla III excepto que, el pH fue cambiando con los diferentes tampones como se indica: ●-● fosfato potásico; △-△ Tris-ClH; ■-■ glicina-KOH; □-□ carbonato sódico; ▲-▲ fosfato sódico.

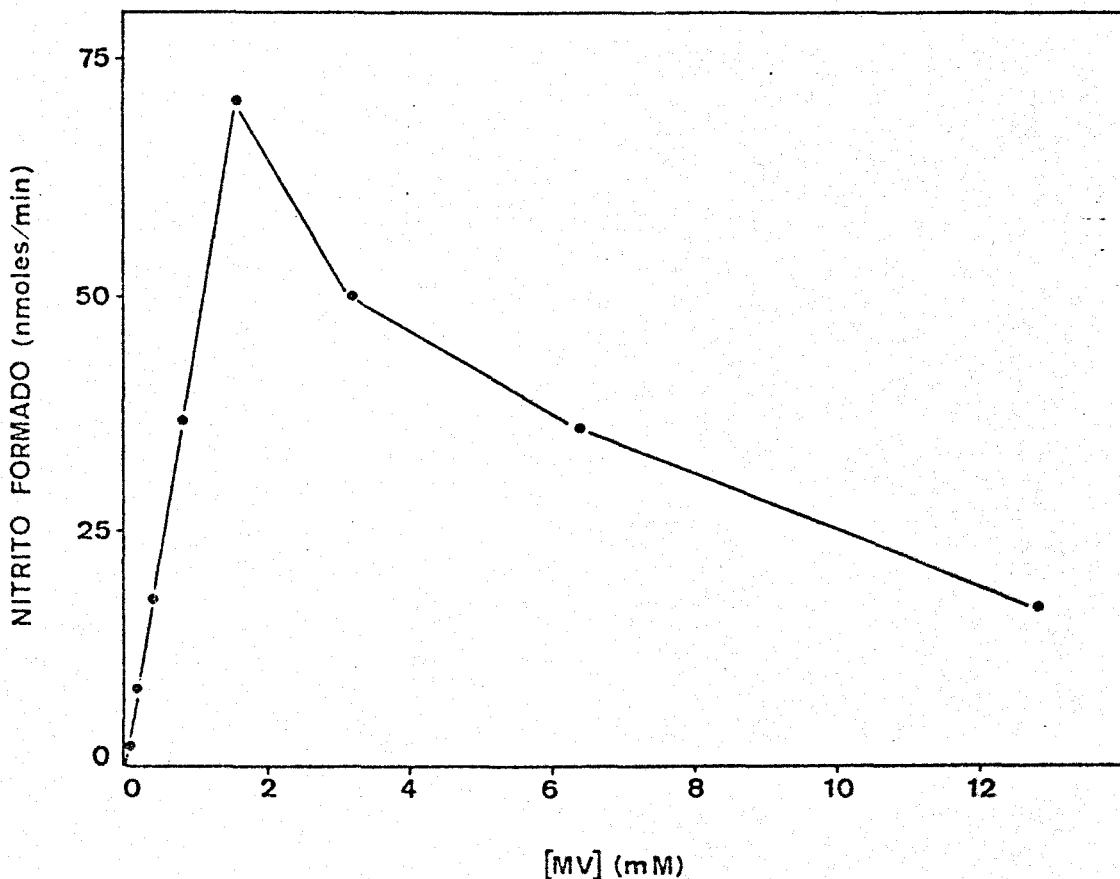


Fig. 2. Efecto de la concentración de metil viológeno en la actividad MVH-nitrato reductasa de *Nostoc muscorum*. La mezcla de ensayo contenía, en un volumen de 1 ml: 100 μ moles de glicina-KOH, pH 10,5; 40 μ moles de NO_3K ; partículas A de *N. muscorum* conteniendo 10 mg de proteína y metil viológeno a las concentraciones indicadas. El ditionito disuelto en bicarbonato se usó a una concentración óptima. Para cada concentración de metil viológeno se probaron tres concentraciones diferentes de ditionito.

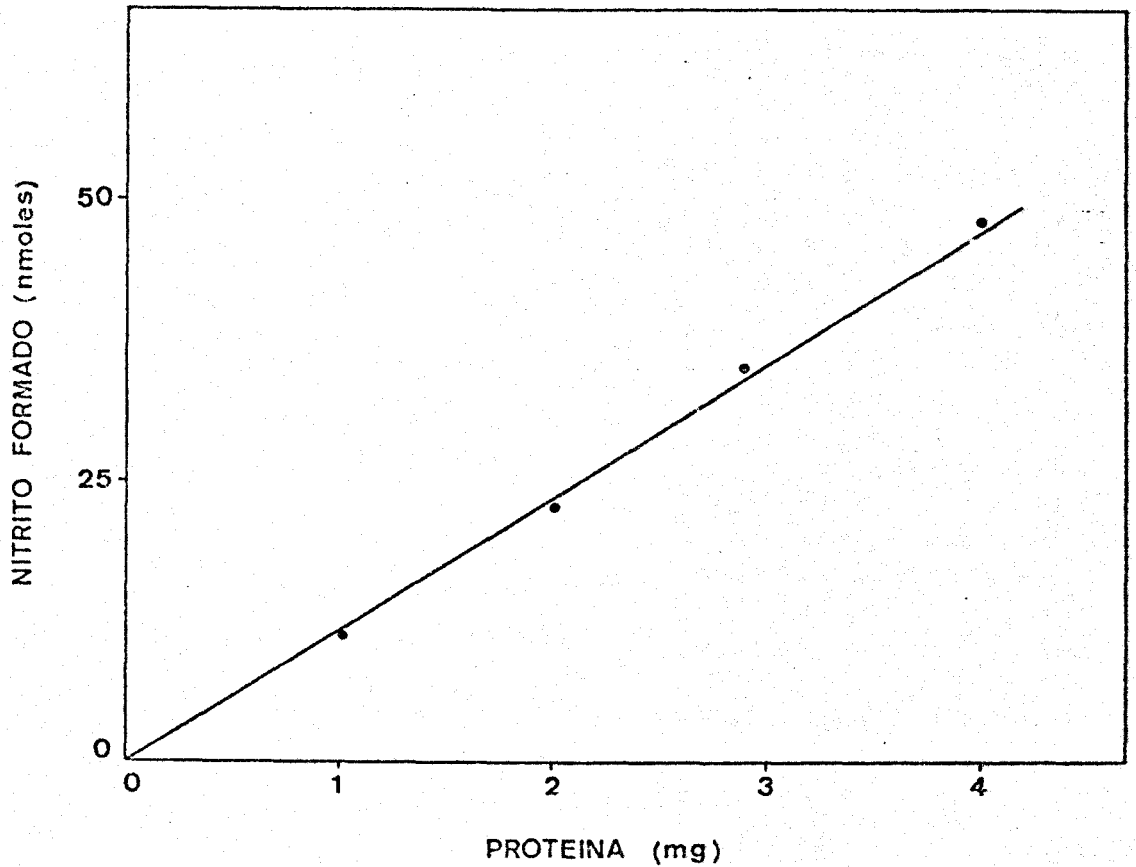


Fig. 3. *Proporcionalidad de la actividad MVH-nitrato reductasa de Nostoc muscorum con la concentración de proteína.* La mezcla de reacción contenía, en un volumen de 1 ml: 100 μ moles de glicina-KOH, pH 10,5; 40 μ moles de NO_3K ; 1,6 μ moles de MV; 8 μ moles de ditionito disueltos en 0,1 ml de CO_3HNa 150 mM y las cantidades de proteína, en mg, que se indican. El tiempo de ensayo fue 5 minutos.

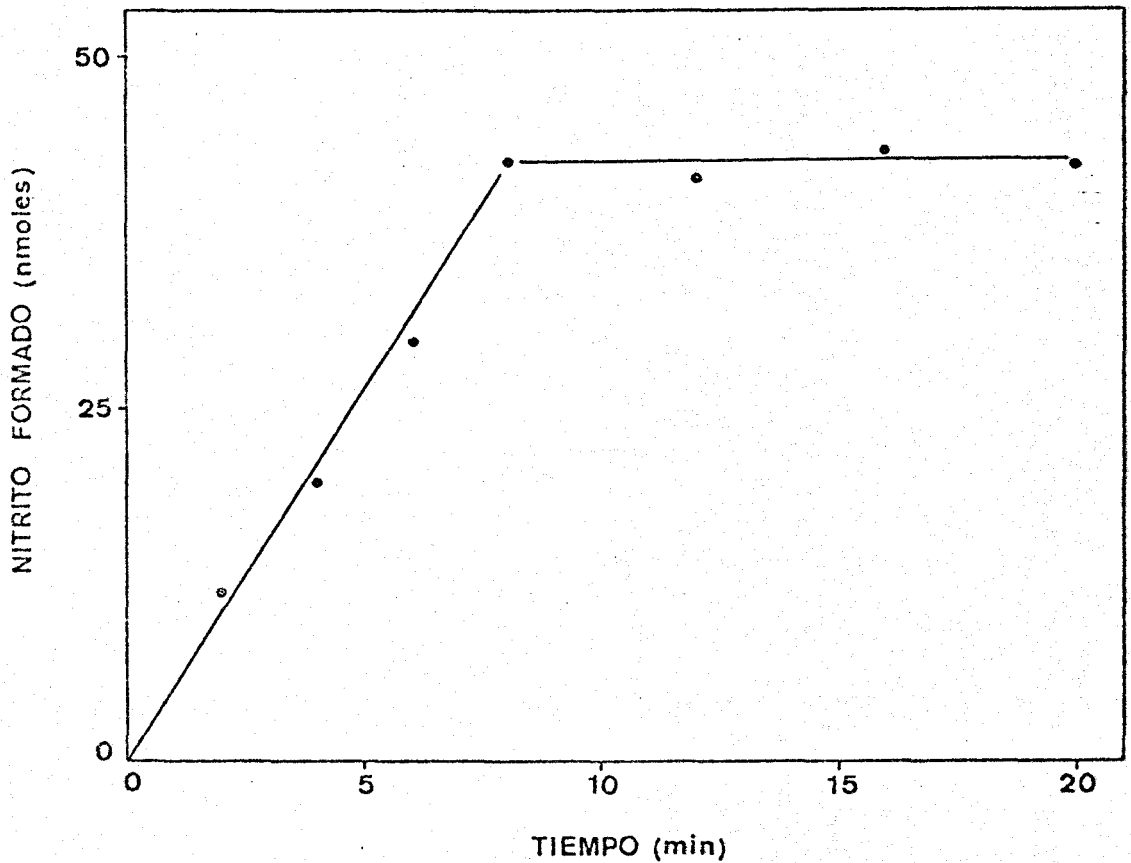


Fig. 4. *Cinética de la actividad MVH-nitrato reductasa de Nostoc muscorum.* Las condiciones experimentales fueron como se indican en la figura anterior. La concentración de proteína fue de 3 mg por ml de mezcla de ensayo.

A.4. Solubilización y purificación parcial de la nitrato reductasa

La solubilización y purificación de la nitrato reductasa de N. muscorum (Tabla IV) se llevaron a cabo según los siguientes pasos:

a) Lavado de partículas.

Las partículas A (Fracción I, Extracto Crudo) obtenidas a partir de 30 g de células se sometieron a tres lavados con tampón Tris-ClH 50 mM, pH 7,5, centrifugándose a continuación a 40.000 x g, 15 min. El sobrenadante del último lavado está prácticamente libre de ficocianina. Las partículas resultantes obtenidas en la última centrifugación fueron resuspendidas en Tris-ClH 50 mM, pH 7,5 y constituyen la Fracción II.

b) Solubilización de la nitrato reductasa.

Las partículas que constituyen la Fracción II se sonicaron durante 30 min (20 Kc, 90 W) con periodos de sonicación de 2 min a intervalos de 1 min. El homogenado resultante se centrifugó a 140.000 x g durante 1 hora y el sobrenadante constituye la Fracción III.

TABLA IV

SOLUBILIZACION Y PURIFICACION PARCIAL DE LA MVH-NITRATO REDUCTASA DE Nostoc muscorum

Fracción	Vol. (ml)	Concentración de proteína (mg/ml)	Proteína total (mg)	Actividad total (mU/min)	% Recuperación	Actividad específica (mU/mg)	Purificación
I. Extracto crudo	130	38,0	4.940	14.040	100	2,9	
II. Partículas lavadas	63	36,0	2.259	20.476	145	12,6	4
III. Enzima soluble	59	8,0	472	6.627	47	14,0	5
IV. Cromatografía en DEAE-celulosa	52	0,4	20,8	6.312	44	303	106

c) Cromatografía de intercambio iónico en DEAE-celulosa.

La fracción anterior se aplicó a una columna de DEAE-celulosa (20 x 100 mm) equilibrada con Tris-ClH 50 mM, pH 7,5. La nitrato reductasa, que queda unida a la columna, se eluye mediante un gradiente de ClNa (0,1-0,3 M) en Tris-ClH 50 mM, pH 7,5. Se recogieron fracciones de 2 ml en las que se analizó la actividad MVH-nitrato reductasa. El conjunto de todas las fracciones que contenían actividad constituye la Fracción IV.

A.5. Represión por amonio de la MVH-nitrato reductasa

En la Tabla V se muestran los niveles de actividad MVH-nitrato reductasa encontrados en extractos de células cultivadas en diferentes fuentes de nitrógeno. Cuando la fuente fué nitrato o nitrito se observaron niveles apreciables de actividad MVH-nitrato reductasa siendo éstos mayores que en nitrato. Si la fuente de nitrógeno era amonio, la actividad MVH-nitrato reductasa fué prácticamente despreciable. Lo mismo ocurrió cuando la fuente de nitrógeno era $\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$, o $\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+$.

TABLA V

REPRESION POR AMONIO DE LA NITRATO REDUCTASA PARTICULADA
DE Nostoc muscorum

Fuente de nitrógeno	Concentración (mM)	Nitrito formado (nmoles/mg proteína)
NO_3K	10	4,0
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	10	0,5
NO_2Na	2	1,1
NO_3NH_4	10	0,3
NO_2NH_4	10	0,0

Las células se crecieron en medios con las fuentes de nitrógeno a las concentraciones en base de nitrógeno que se indican. Posteriormente, se recogieron en fase logaritmica de crecimiento, se prepararon extractos crudos y se analizó su actividad MVH-nitrato reductasa, como se indica en Materiales y Métodos.

A.6. Donador fisiológico de electrones de la nitrato reductasa

A.6.1. *Ferredoxina reducida en la oscuridad*

Las partículas de N. muscorum utilizan NADPH como donador de electrones para la reducción de nitrato. Esta reducción requiere la presencia de ferredoxina y es estimulada por FAD (Tabla VI).

La actividad de reducción de nitrato con NADPH y ferredoxina presenta un pH óptimo de 8,5 (Fig. 5).

Concentraciones relativamente altas de NADPH producen una inhibición de esta reducción de nitrato dependiente de ferredoxina (Fig. 6).

A.6.2. *Ferredoxina reducida a la luz*

La ferredoxina de N. muscorum, reducida por el poder reductor originado en las partículas fotosintéticas a partir de luz y el par ascorbato/DPIP, es donador de electrones para la reducción enzimática de nitrato a nitrito. Las partículas de N. muscorum iluminadas donan los electrones a la nitrato reductasa solamente a través de la ferredoxina. En ausencia de ferredoxina, ascorbato/DPIP, o en la oscuri-

TABLA VI

REDUCCION DE NITRATO DEPENDIENTE DE FERREDOXINA EN LA OSCURIDAD
 POR NADPH CON PARTICULAS DE Nostoc muscorum

Sistema	Nitrito formado (nmoles)
Completo	148
menos NADPH	9
menos ferredoxina	10
menos nitrato	0
menos partículas	1
más FAD	232

El sistema completo contenía, en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de Tris-ClH, pH 8,5; 40 μ moles de NO_3K ; 0,2 mg de ferredoxina de N. muscorum; 2,4 μ moles de NADPH; partículas A de N. muscorum conteniendo 10 mg de proteína y, según se indica, 20 μ moles de FAD. Tiempo de ensayo, 30 min. Otras condiciones experimentales se indican en Materiales y Métodos.

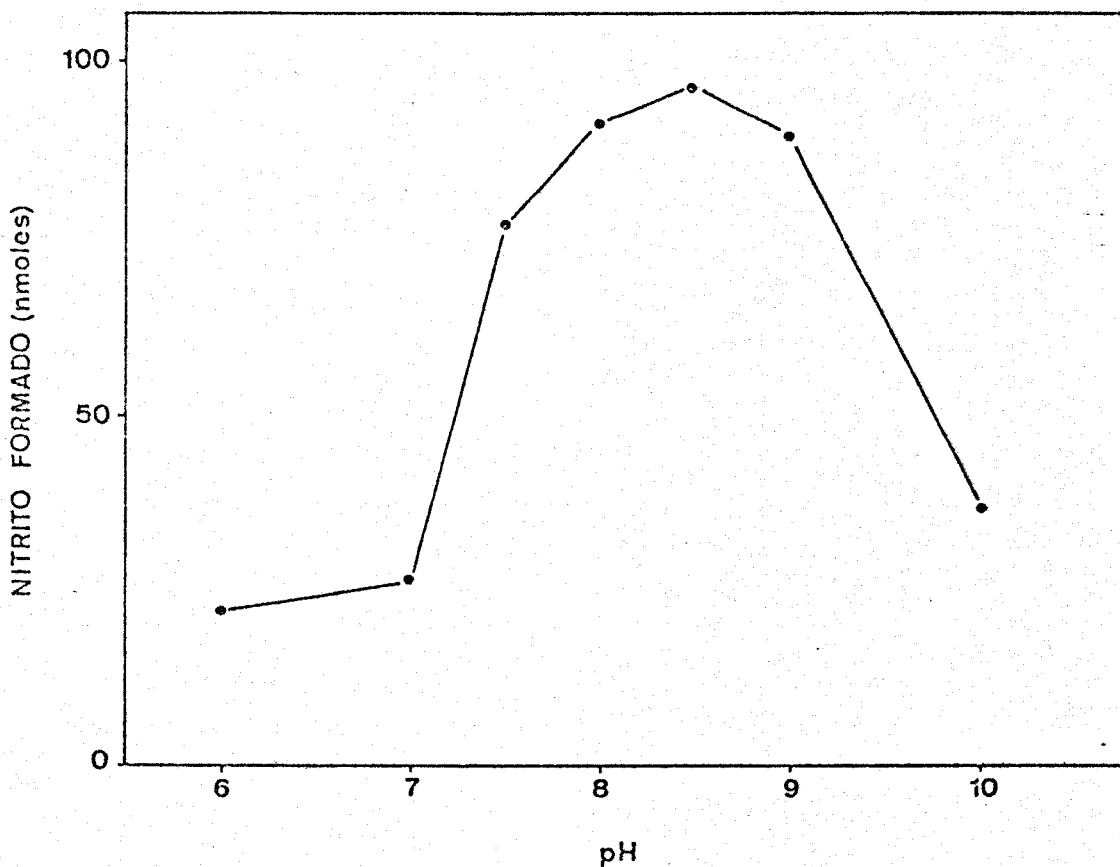


Fig. 5. Efecto del pH en la actividad NADPH-NO₃Rasa de *Nostoc muscorum*. Las condiciones experimentales son como en la Tabla VI excepto que el pH de la reacción se consiguió con los siguientes tampones: citrato sódico (pH 6,0); fosfato potásico (pH 7,0); Tris-ClH (pH 7,5; 8,0; 8,5; 9,0); glicina-KOH (pH 10,0).

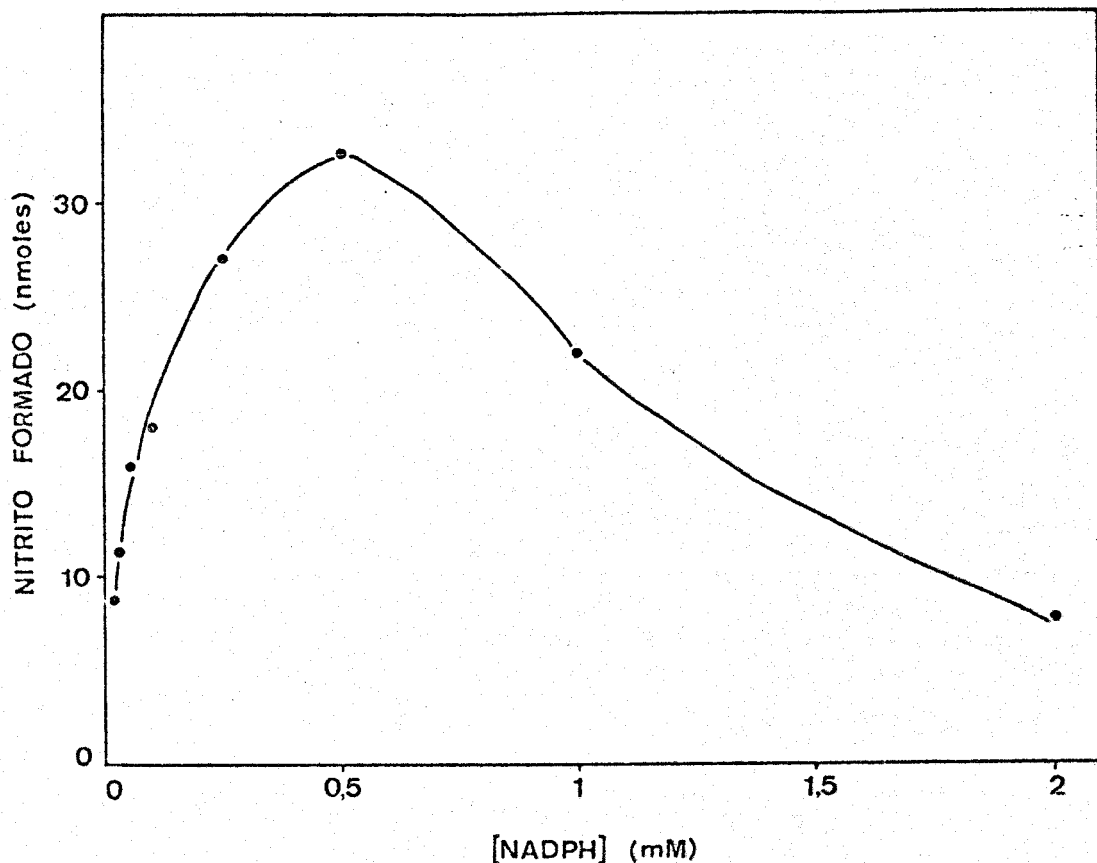


Fig. 6. Efecto de la concentración de NADPH sobre la actividad NADPH- NO_3 Rasa de *Nostoc muscorum*. La mezcla de ensayo contenía, en un volumen de 1 ml: 100 μ moles de Tris-ClH, pH 8,5; 40 μ moles de NO_3K ; 0,1 mg de ferredoxina de *N. muscorum*; partículas A de *N. muscorum*, conteniendo 20 mg de proteína y NADPH a las concentraciones que se indican. Después de 20 minutos a 30°C se analizó el nitrito formado en la reacción.

TABLA VII

FOTORREDUCCION DE NITRATO DEPENDIENTE DE FERREDOXINA CON
UNA PREPARACION PARTICULADA DE Nostoc muscorum

Sistema	Nitrito formado (nmoles/mg clorofila)
Completo	440
menos ferredoxina	60
menos nitrato	10
menos ascorbato/DPIP	10
menos partículas	10
Completo, oscuridad	10

El sistema completo contenía, en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 40 μ moles de NO_3K ; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum; 1,4 mg de ascorbato sódico; 60 μ g de DPIP y partículas A de N. muscorum conteniendo 90 μ g de clorofila. La reacción se llevó a cabo en la luz a 25°C durante 10 min.

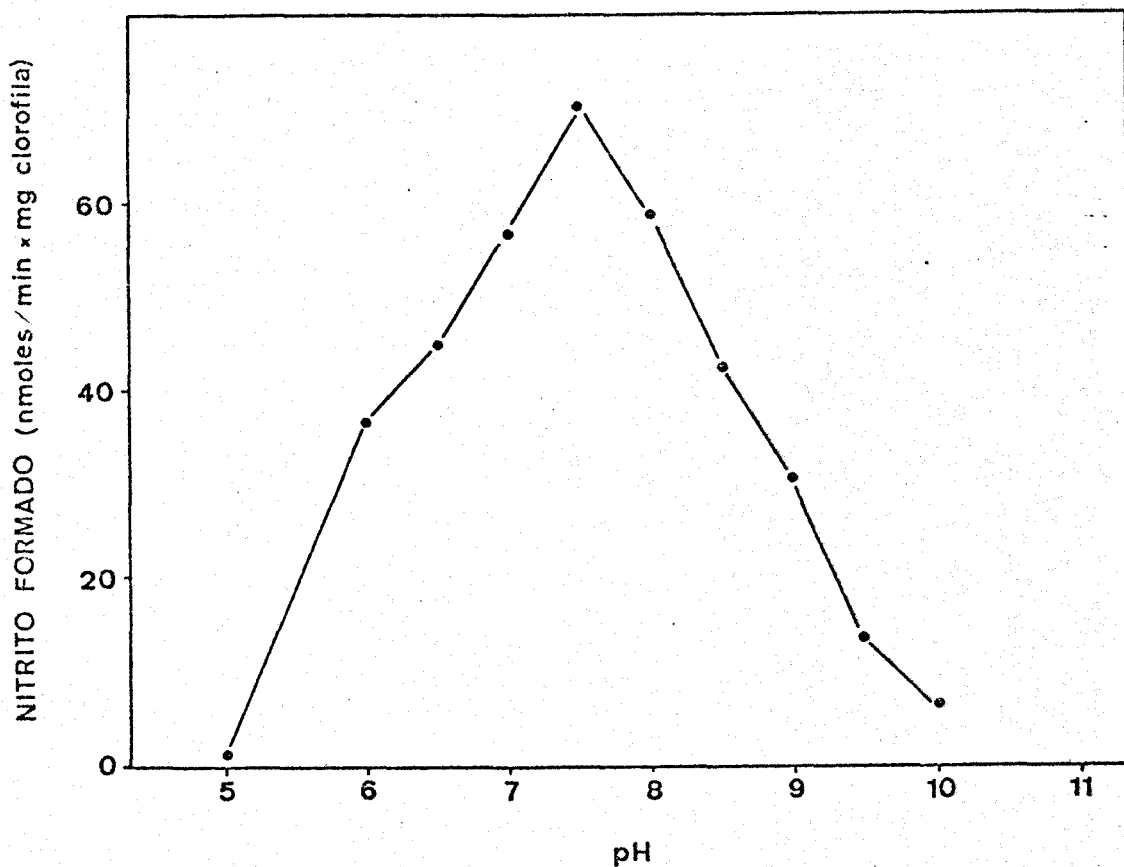


Fig. 7. Efecto del pH en la fotorreducción de nitrato en *Nostoc muscorum* con el par ascorbato/DPIP. Las condiciones experimentales fueron como las descritas en la Tabla V, excepto que el pH de la reacción se consiguió con los siguientes tampones: acetato sódico (pH 5,0); citrato sódico (pH 6,0); fosfato potásico (pH 6,5; 7,0); Tris-ClH⁻ (pH 7,5; 8,0; 8,5); glicina-KOH (pH 9,0; 9,5; 10,0).

dad la reacción no tiene lugar (Tabla VII).

Como se observa en la Fig. 7, el pH óptimo de esta fotorreducción de nitrato es 7,5.

B. REDUCCION FOTOSINTETICA DE NITRATO POR PARTICULAS SUB-CELULARES DE Nostoc muscorum

B.1. Fotorreducción de nitrato dependiente de ferredoxina con agua

Las partículas de N. muscorum tipo B son capaces de reducir el nitrato, a la luz y en presencia de Cl_2Mg (9), usando agua como donador de electrones. Esta reducción no tiene lugar en ausencia de ferredoxina o en la oscuridad (Tabla VIII).

B.2. Efecto del CMU en la fotorreducción de nitrato con agua

En la Tabla IX se muestra el efecto inhibitor del CMU, inhibitor del flujo fotosintético (66), en la fotorreducción de nitrato con agua y la restauración de la reducción de nitrato a nitrito cuando se añade junto al CMU, ascorbato y DPIP.

TABLA VIII

FOTORREDUCCION DE NITRATO DEPENDIENTE DE FERREDOXINA POR
 PARTICULAS DE Nostoc muscorum CON AGUA COMO DONADOR
 DE ELECTRONES

Sistema	Nitrito formado (nmoles/mg protefna)
Completo	710
menos ferredoxina	96
menos nitrato	0
menos ADP, P _i	790
Completo, oscuridad	8

El sistema completo contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 10 μ moles de Cl₂Mg; 40 μ moles de NO₃K; 2 μ moles de ADP; 2 μ moles de PO₄HK₂; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum y partículas B de N. muscorum conteniendo 0,1 mg de clorofila. La reacción se llevó a cabo a la luz a 25°C durante 30 min.

TABLA IX

EFFECTO DEL CMU EN LA FOTORREDUCCION DE NITRATO POR PARTICULAS
 DE Nostoc muscorum Y RESTAURACION DE LA ACTIVIDAD INHIBIDA
 POR ASCORBATO/DPIP

Sistema	Nitrito formado (nmoles/mg clorofila)
Completo	200
más CMU	40
más CMU, ascorbato/DPIP	216
Completo, oscuridad	50

El sistema completo contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 10 μ moles de Cl_2Mg ; 40 μ moles de NO_3K ; 2 μ moles de ADP; 2 μ moles de PO_4HK_2 ; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum; partículas B de N. muscorum conteniendo 30 μ g de clorofila y, según se indica, 100 nmoles de CMU, 1,4 mg de ascorbato y 60 μ g de DPIP. La reacción fue a 25°C durante 30 min en la luz.

B.3. Efecto del pH sobre la fotorreducción de nitrato con agua

La fotorreducción de nitrato con agua tiene un pH óptimo entre 7 y 8 como se aprecia en la Fig. 8.

B.4. Estudio cinético de la fotorreducción de nitrato con agua

Al estudiar la cinética de la fotorreducción de nitrato usando agua como fuente de electrones y ferredoxina como cofactor, se observa que la velocidad de formación de nitrito permanece constante al menos durante los treinta primeros minutos de la reacción (Fig. 9).

B.5. Proporcionalidad de la fotorreducción de nitrato con agua con la concentración de clorofila

La reducción fotosintética de nitrato dependiente de ferredoxina es proporcional a la concentración de clorofila como muestra la Fig. 10.

B.6. Fotorreducción de nitrato a nitrito con agua acoplada al desprendimiento estequiométrico de oxígeno

La fotorreducción de nitrato a nitrito con agua, en partículas tipo C de N. muscorum, va acompañada de un despren-

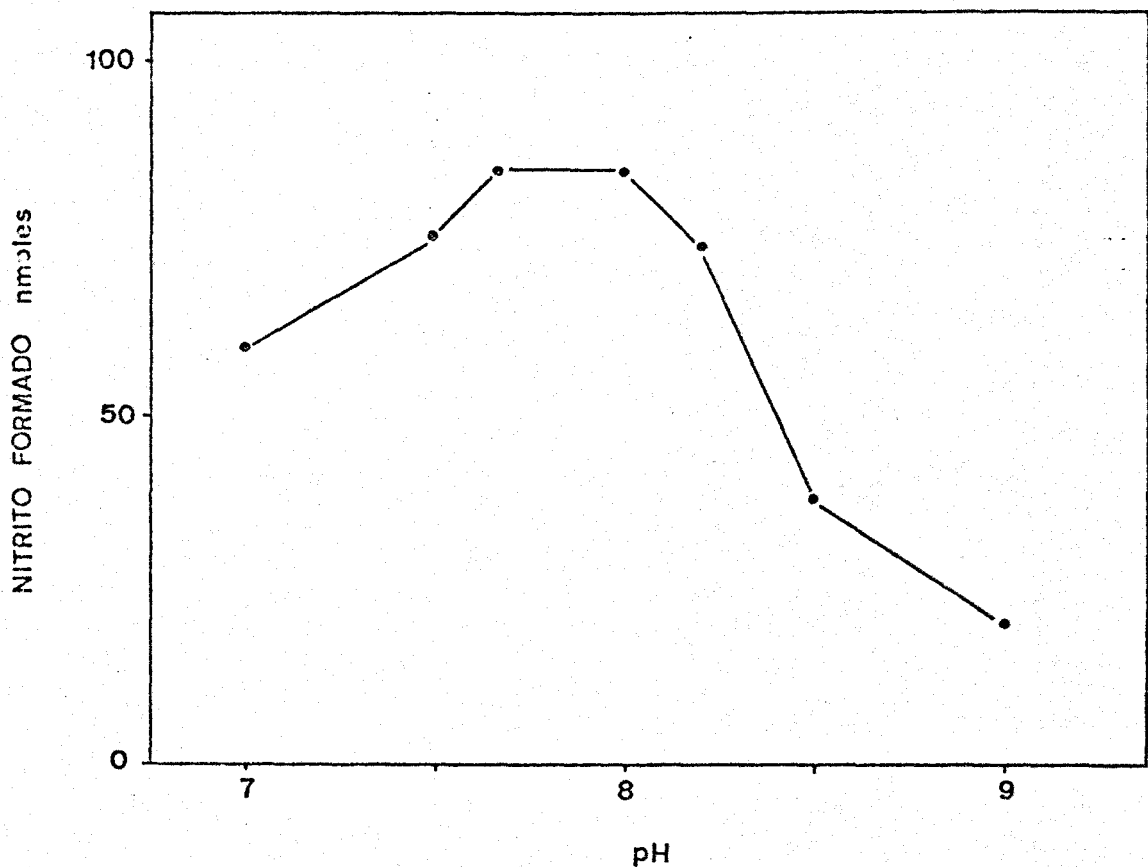


Fig. 8. Efecto del pH sobre la fotorreduccion de nitrato en *Nostoc muscorum* con agua como donador de electrones. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las de la Tabla VIII, excepto que se omitió el ADP y PO_4HK_2 , y que se varió el pH usando solamente el tampón Tricina-KOH.

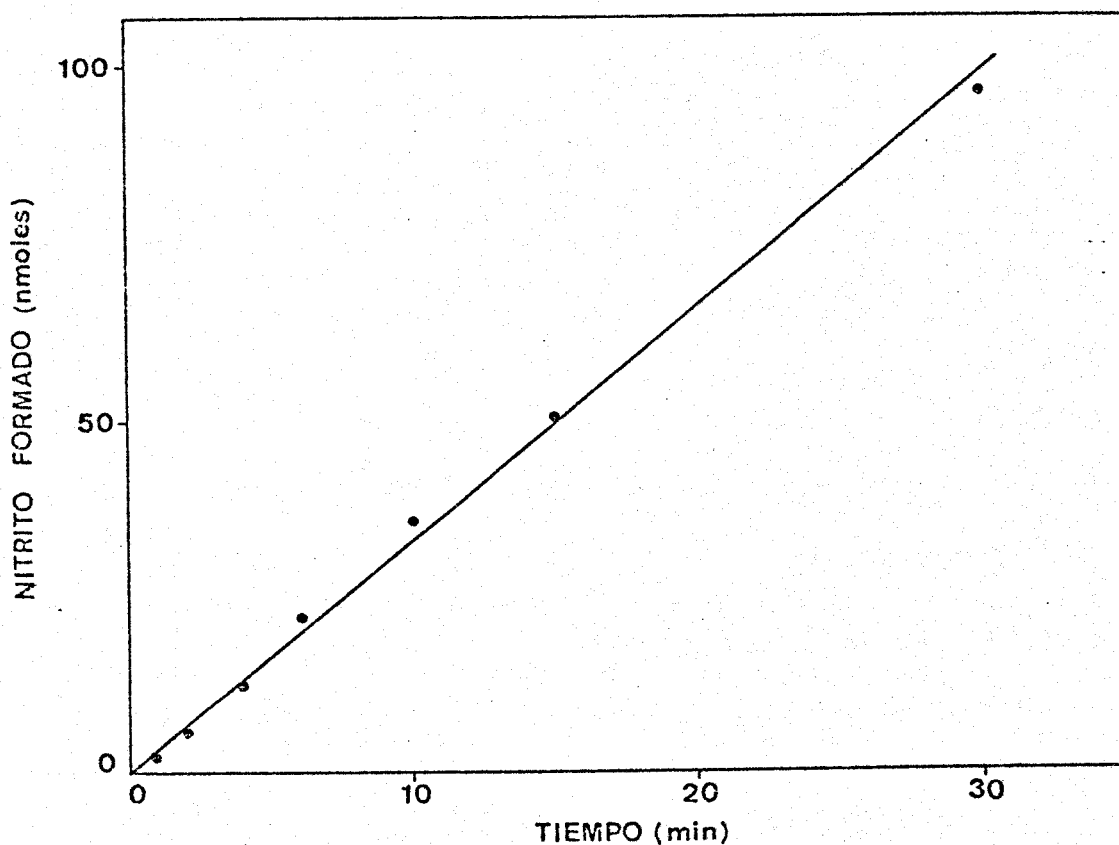


Fig. 9. *Cinética de fotorreducción de nitrato en Nostoc muscorum con agua como donador de electrones.* Las mezclas de ensayo contenían, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 10 μ moles de Cl_2Mg ; 40 μ moles de NO_3K ; 0,1 mg de ferredoxina de *N. muscorum* y partículas B de *N. muscorum* conteniendo 20 μ g de clorofila. La reacción se llevó a cabo a la luz a 30°C. A los tiempos indicados se analizó el nitrito formado.

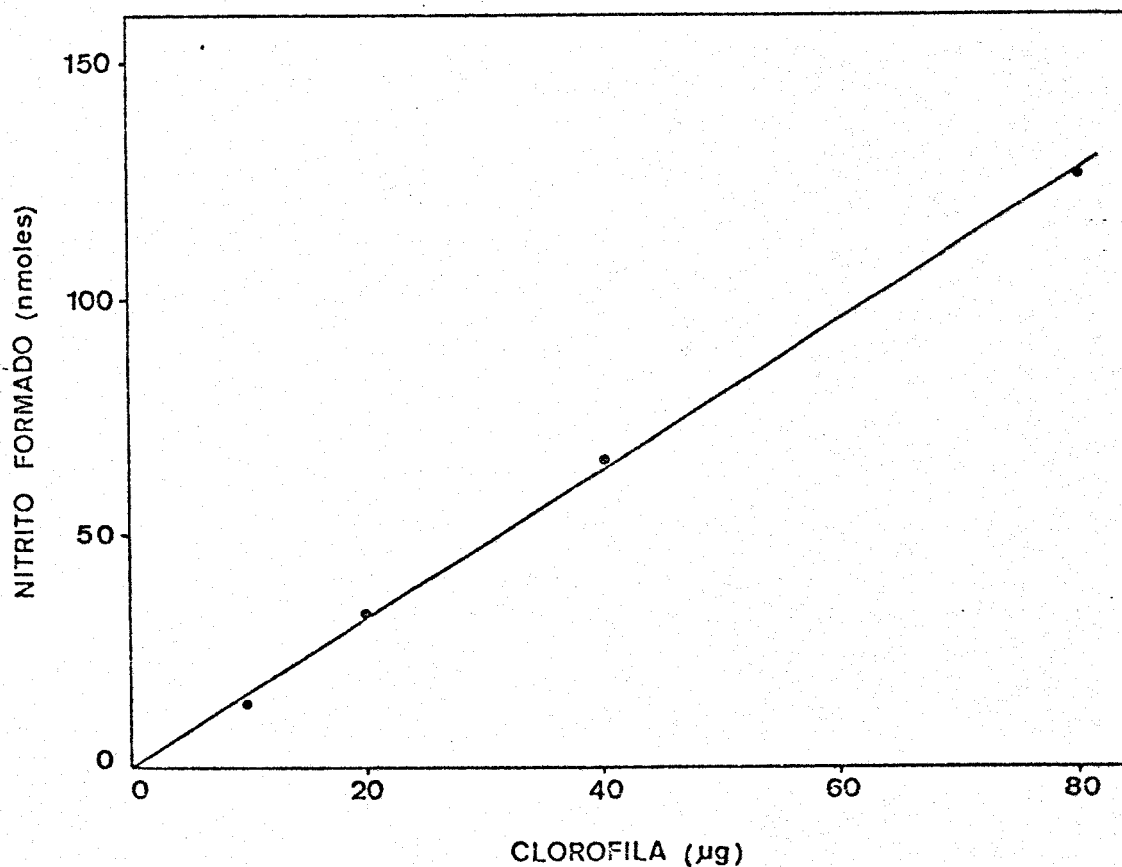


Fig. 10. Proporcionalidad entre la fotorreducción de nitrato y la concentración de clorofila en *Nostoc muscorum* con agua como donador de electrones. La mezcla de ensayo contenía, en un volumen de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 10 μ moles de Cl_2Mg ; 40 μ moles de NO_3K ; 0,1 mg de ferredoxina de *N. muscorum* y partículas B de *N. muscorum* conteniendo las cantidades de clorofila en μg que se indican. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 10 min a la luz.

TABLA X

FOTORREDUCCION DE NITRATO A NITRITO CON AGUA ACOPLADA AL
 DESPRENDIMIENTO ESTEQUIOMETRICO DE OXIGENO POR PARTICULAS
 DE Nostoc muscorum

Sistema	Nitrito formado (nmoles)	Oxígeno desprendido (nmoles)
Completo	960	450
menos ferredoxina	126	68
menos nitrato	3	0
más CMU	4	0
Completo, oscuridad	5	0

El sistema completo contenía, en un volumen final de 3 ml: 150 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 60 μ moles de NO_3K ; 30 μ moles de Cl_2Mg ; 0,3 mg de ferredoxina N. muscorum y partículas C de N. muscorum conteniendo 0,4 mg de clorofila. Donde se indica se añadieron 0,3 μ moles de CMU. La reacción fué a la luz a 30°C durante 10 min.

dimiento estequiométrico de oxígeno, como se observa en la Tabla X.

C. REGULACION DE LA ACTIVIDAD NITRATO REDUCTASA EN PARTICULAS SUBCELULARES DE Nostoc muscorum

C.1. Interconversión por oxido-reducción de la MVH-nitrato reductasa

C.1.1. *Inactivación por ditionito de la MVH-nitrato reductasa y protección por diferentes compuestos frente a dicha inactivación*

La inactivación por ditionito de la MVH-nitrato reductasa es impedida cuando el tratamiento se realiza en presencia de MV, nitrato, cianato o ferredoxina. Como se observa en la Tabla XI, el cianato impide casi totalmente la inactivación por ditionito, mientras que el MV, ferredoxina y nitrato solo realizan una protección parcial, siendo este último el menos efectivo.

C.1.2. *Inactivación por reducción química con ditionito y reactivación por oxidación con ferricianuro de la MVH-nitrato reductasa*

Al preincubar partículas de N. muscorum conteniendo

TABLA XI

PROTECCION DE DISTINTOS COMPUESTOS EN LA INACTIVACION POR
 DITIONITO DE LA NITRATO REDUCTASA PARTICULADA DE Nostoc muscorum

Adición	Actividad relativa (%)
Ninguna	100
$S_2O_4^{=}$	27
$S_2O_4^{=}$, MV	68
$S_2O_4^{=}$, NO_3K	48
$S_2O_4^{=}$, CNOK	86
$S_2O_4^{=}$, ferredoxina	65

La mezcla de preincubación contenía, en un volumen de 0,5 ml: 25 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; partículas B' de N. muscorum conteniendo 2 mg de proteína y, según se indica, 4 μ moles de $S_2O_4Na_2$ disueltos en 0,05 ml de CO_3HNa 150 mM, 0,8 μ moles de MV, 20 μ moles de NO_3K , 1 μ mol de CNOK y 50 μ g de ferredoxina de N. muscorum. Después de preincubar durante 30 min a 30°C, se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se analizó la actividad MVH-nitrato reductasa como se indica en Materiales y Métodos. En alícuotas de 0,1 ml tomadas paralelamente se analizó el nitrito formado durante la preincubación. El 100% de actividad corresponde a 64 nmoles de nitrito formado durante 5 min.

TABLA XII

INACTIVACION POR REDUCCION Y REACTIVACION POR OXIDACION DE
LA NITRATO REDUCTASA PARTICULADA DE Nostoc muscorum

Adición	Actividad relativa (%)	
	-FeCy	+FeCy ^a
Ninguna	100	81
S ₂ O ₄ ⁼	30	94

La mezcla de preincubación contenía en un volumen de 0,5 ml: 25 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; partículas B' de N. muscorum conteniendo 2 mg de proteína y, según se indica, 4 μ moles de S₂O₄Na₂ disueltos en 0,05 ml de CO₃HNa 150 mM. Al cabo de 30 min de preincubación a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se ensayó la actividad MVH-nitrato reductasa a 30°C como se indica en Materiales y Métodos.

^aEl enzima preincubado con el reductor se mantuvo a 0°C durante 2 min con ferricianuro 0,3 mM antes de la determinación de su actividad.

El 100% de actividad corresponde a 64 nmoles de nitrato formado durante 5 min.

nitrato reductasa en presencia de ditionito se observa la pérdida de la actividad MVH-nitrato reductasa. Dicha actividad se restaura cuando el enzima previamente inactivo se oxida con ferricianuro (Tabla XII).

C.1.3. *Inactivación reversible de la MVH-nitrato reductasa por ferredoxina reducida en la oscuridad con NADPH y protección por nitrato*

Al preincubar partículas de N. muscorum conteniendo actividad NADP-reductasa y MVH-nitrato reductasa en la oscuridad con NADPH tiene lugar una inactivación dependiente de ferredoxina de la actividad MVH-nitrato reductasa. Si el nitrato está presente durante la preincubación no tiene lugar la inactivación por NADPH. Al tratar el enzima inactivo con ferricianuro se recupera totalmente la actividad original (Tabla XIII).

C.1.4. *Inactivación reversible de la MVH-nitrato reductasa por ferredoxina reducida a la luz con el par ascorbato/DPIP*

Al iluminar partículas de N. muscorum conteniendo la nitrato reductasa, en presencia del par ascorbato/DPIP, se produce una inactivación dependiente de ferredoxina de la

TABLA XIII

INACTIVACION DEPENDIENTE DE FERREDOXINA DE LA NITRATO
 REDUCTASA PARTICULADA DE Nostoc muscorum POR NADPH Y
 PROTECCION POR NITRATO

Adición	Actividad relativa (%)	
	-FeCy	+FeCy ^a
Ninguna	100	87
NADPH	78	75
NADPH, ferredoxina	18	69
NADPH, ferredoxina, NO ₃ K	85	84

La mezcla de preincubación contenía, en un volumen final de 0,5 ml: 25 μ moles de Tris-ClH, pH 8,5; partículas A de N. muscorum lavadas, con objeto de eliminar totalmente la ferredoxina, conteniendo 4 mg de proteína y, donde se indica, 4,8 μ moles de NADPH, 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum y 20 μ moles de NO₃K. Después de 2 horas a 30°C, se tomaron alícuotas de 0,05 ml y se ensayó la actividad MVH-nitrato reductasa según se describe en Materiales y Métodos. En alícuotas de 0,05 ml tomadas paralelamente se analizó el nitrito formado durante la preincubación.

^aEl tratamiento con ferricianuro se realizó en las condiciones indicadas en la Tabla XII.

El 100% de actividad corresponde a la formación de 55 nmoles de nitrito durante 5 min.

TABLA XIV

INACTIVACION DEPENDIENTE DE FERREDOXINA DE LA NITRATO REDUCTASA
 PARTICULADA DE Nostoc muscorum EN LA LUZ POR EL SISTEMA
 ASCORBATO/DPIP Y REACTIVACION POR FERRICIANURO

Sistema	Actividad específica (%)	
	-FeCy	+FeCy ^a
Completo, oscuridad	100	100
Completo, luz	45	84
menos ferredoxina	95	97

La mezcla de preincubación del sistema completo contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de Tris-ClH, pH 7,5; 1,4 mg de ascorbato sódico; 60 μ g de DPIP; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum y partículas B de N. muscorum lavadas, al objeto de eliminar totalmente la ferredoxina, conteniendo 100 μ g de clorofila. La preincubación se llevó a cabo a la luz a 30°C durante 30 min. La actividad MVH-nitrato reductasa se determinó en alícuotas de 0,1 ml según se indica en Materiales y Métodos.

^aEl tratamiento con ferricianuro se realizó en las condiciones indicadas en la Tabla XII.

El 100% de actividad corresponde a la formación de 42 nmoles de nitrito por min.

MVH-nitrato reductasa. La inactivación se revierte por oxidación del enzima con ferricianuro (Tabla XIV).

C.1.5. *Caracterización de la inactivación por iluminación de la MVH-nitrato reductasa*

Al exponer a la luz las partículas de N. muscorum tipo B capaces de utilizar agua como donador de electrones en la fotorreducción de nitrato (cfr. B), tiene lugar la inactivación de la MVH-nitrato reductasa. Esta inactivación es dependiente de ferredoxina, se inhibe por CMU, y la presencia de nitrato protege completamente frente la inactivación por reducción a través de la ferredoxina (Tabla XV).

C.1.6. *Reactivación por oxígeno de la MVH-nitrato reductasa previamente inactivada por reducción a la luz*

Cuando la nitrato reductasa inactivada por reducción a la luz se mantiene durante 5 horas en la oscuridad, en atmósfera de oxígeno, tiene lugar la recuperación de la actividad enzimática como puede observarse en la Fig. 11.

TABLA XV

INACTIVACION POR LA LUZ DEPENDIENTE DE FERREDOXINA DE LA
 NITRATO REDUCTASA PARTICULADA DE Nostoc muscorum Y
 PROTECCION POR NITRATO

Sistema	Actividad relativa (%)
Completo, oscuridad	100
Completo, luz	34
más CMU	95
más NO ₃ K	94
menos ferredoxina	88

El sistema completo de la mezcla de preincubación contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 10 μ moles de Cl₂Mg; partículas B de N.muscorum lavadas, al objeto de eliminar la ferredoxina, conteniendo 10 μ g de clorofila y, según se indica, 100 μ moles de CMU; 40 μ moles de NO₃K y 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum. Al cabo de 30 min de preincubación a 30°C a la luz se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se analizó la actividad MVH-nitrato reductasa según se describe en Materiales y Métodos. En alícuotas de 0,1 ml tomadas por duplicado se analizó el nitrito formado durante la preincubación. El 100% de actividad corresponde a 48 nmoles de nitrito formado durante 5 min.

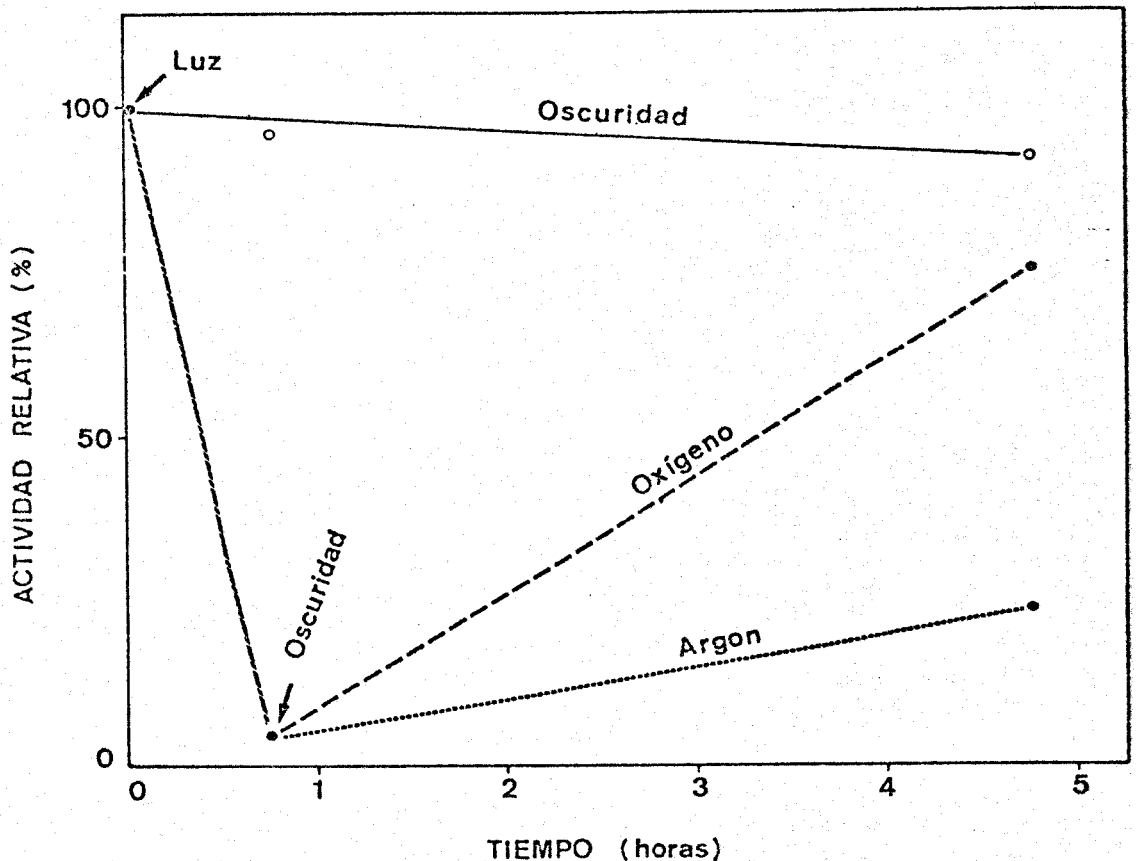


Fig. 11. Inactivación por la luz de la nitrato reductasa de *Nostoc muscorum* y reactivación por oxígeno. La mezcla de preincubación contenía, en un volumen final de 2 ml: 100 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 20 μ moles de Cl_2Mg ; 0,2 mg de ferredoxina de *N. muscorum* y partículas B de *N. muscorum* que contenían 0,1 mg de clorofila. Esta mezcla se preincubó a 30°C durante 45 min en la luz. Transcurrido este tiempo, las partículas tratadas se mantuvieron en la oscuridad bajo Ar ó bajo O_2 durante 4 horas. La actividad MVH- NO_3 Rasa se determinó en alícuotas de 0,2 ml como se ha descrito en Materiales y Métodos.

C.2. Papel del amonio en la regulación de la nitrato reductasa

C.2.1. *Efecto del amonio en la reducción de nitrato por distintos sistemas donadores de electrones*

La reducción de nitrato a nitrito en la oscuridad por la nitrato reductasa con metil-viológeno reducido químicamente con ditionito así como con ferredoxina reducida por el sistema NADPH/NADP-reductasa, no se afecta con la presencia de amonio en la mezcla de ensayo. Sin embargo, como se observa en la Tabla XVI, el amonio inhibe drásticamente la reducción fotosintética de nitrato con agua.

C.2.2. *Inhibición de la fotorreducción de nitrato por desacoplantes de la fotofosforilación*

El amonio así como la metilamina y el arseniato son conocidos desacoplantes de la fotofosforilación (19,32). Como se desprende de los resultados de la Tabla XVII, todos estos desacoplantes ejercen un efecto inhibitor en la fotorreducción de nitrato siendo el amonio el más efectivo.

C.2.3. *Inhibición de la fotorreducción de nitrato por los sistemas ADP/P_i y amonio/ADP*

El ADP y fosfato actúan acelerando el flujo fotosintético.

TABLA XVI

ESTUDIO COMPARATIVO DEL EFECTO DEL AMONIO EN LA REDUCCION DE
 NITRATO EN PARTICULAS DE Nostoc muscorum POR DIFERENTES
 SISTEMAS DONADORES DE ELECTRONES

Sistema donador de electrones		Nitrito formado (nmoles)
I. H ₂ O	Completo, luz	177
	más amonio	17
II. MVH	Completo	140
	más amonio	160
III. NADPH	Completo	137
	más amonio	104

I. El sistema completo contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 10 μ moles de Cl₂Mg; 40 μ moles de NO₃K; 2 μ moles de ADP; 2 μ moles de PO₄HK₂; 0,1 mg de ferredoxina de Nostoc; partículas B de N. muscorum con teniendo 26 μ g de clorofila y, donde se indica, 10 μ moles de ClNH₄. La reacción se llevó a cabo a 30°C a la luz durante 20 min.

II. El sistema completo contenía, en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de glicina-KOH, pH 10,5; 10 μ moles de NO₃K; 1,6 μ moles de MV; 8 μ moles de S₂O₄Na₂ disueltos en 0,1 ml de CO₃HNa 150 mM; partículas B de N. muscorum con teniendo 4 mg de proteína y, donde se indica, 10 μ moles de ClNH₄. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 7 min.

III. El sistema completo contenía en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de Tris-ClH, pH 8,5; 40 μ moles de NO₃K; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum; 2,4 μ moles de NADPH y, donde se indica, 10 μ moles de ClNH₄. La reacción se llevó a cabo a 30°C durante 30 min.

TABLA XVII

EFFECTO DEL AMONIO Y OTROS DESACOPANTES DE LA FOTOFOSFORILACION
 EN LA FOTORREDUCCION DE NITRATO CON PARTICULAS DE
Nostoc muscorum

Sistema	Nitrito formado (nmoles)
Completo	124
más amonio	19
más arseniato	45
más metilamina	27

El sistema completo fué como el descrito en la leyenda de la Tabla XVI. Donde se indica, se añadieron 10 μ moles de ClNH_4 ; 10 μ moles de metilamina o 40 μ moles de arseniato. En el experimento con arseniato el PO_4HK_2 se omitió de la mezcla de reacción.

tico de electrones desde agua (2). Como se observa en la Tabla XVIII, la presencia de ADP y fosfato produce una inhibición en la fotorreducción de nitrato. aun cuando el grado de dicha inhibición es inferior al ejercido por el amonio. El ADP que no ejerce por sí prácticamente ningún efecto en la fotorreducción de nitrato, produce un aumento en la inhibición por amonio de la fotorreducción de nitrato.

C.2.4. *Inhibición por amonio de la fotorreducción de nitrato y del desprendimiento concomitante de oxígeno*

La inhibición producida por el amonio en la reducción fotosintética de nitrato a nitrito, dependiente de ferredoxina, va acompañada de una disminución paralela del desprendimiento fotosintético de oxígeno (Tabla XIX).

El desprendimiento fotosintético de oxígeno, proporcional al tiempo, que tiene lugar en partículas de N. muscorum al añadir nitrato (Fig. 12a), no ocurre prácticamente si está presente el amonio desde el comienzo de la reacción (Fig. 12b). La adición de amonio, una vez comenzada la reacción, produce también una inhibición del desprendimiento de oxígeno (Fig. 12c).

TABLA XVIII

EFFECTO DE LOS SISTEMAS ADP/P_i Y AMONIO/ADP EN LA FOTORREDUCCION
DE NITRATO CON PARTICULAS DE Nostoc muscorum

Adición	Nitrito formado (nmoles)
Ninguna	63
Amonio	14
ADP	78
ADP/P _i	45
ADP, amonio	8

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 10 μ moles de Cl₂Mg; 20 μ moles de NO₃K; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum; partículas B de N. muscorum conteniendo 10 μ g de clorofila y, según se indica, 2 μ moles de ADP; 2 μ moles de PO₄HK₂ y 10 μ moles de ClNH₄. La reacción se llevó a cabo a la luz a 30°C durante 30 min.

TABLA XIX

EFFECTO DEL AMONIO EN LA FOTORREDUCCION DE NITRATO Y EN EL
 DESPRENDIMIENTO CONCOMITANTE DE OXIGENO EN PARTICULAS
 DE Nostoc muscorum

Adición	Nitrito formado (nmoles)	Oxígeno desprendido (nmoles)
Ninguna	195	90
Amonio	54	30

La mezcla de ensayo contenía, en un volumen de 3 ml: 150 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 30 μ moles de Cl_2Mg ; 60 μ moles de NO_3K ; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum; partículas C^3 de N. muscorum conteniendo 82 μ g de clorofila, y, según se indica, 30 μ moles de $ClNH_4$. La reacción se llevó a cabo a 30°C a la luz durante 15⁴ min en el electrodo de oxígeno. La determinación de nitrito y oxígeno fué como se indica en Materiales y Métodos.

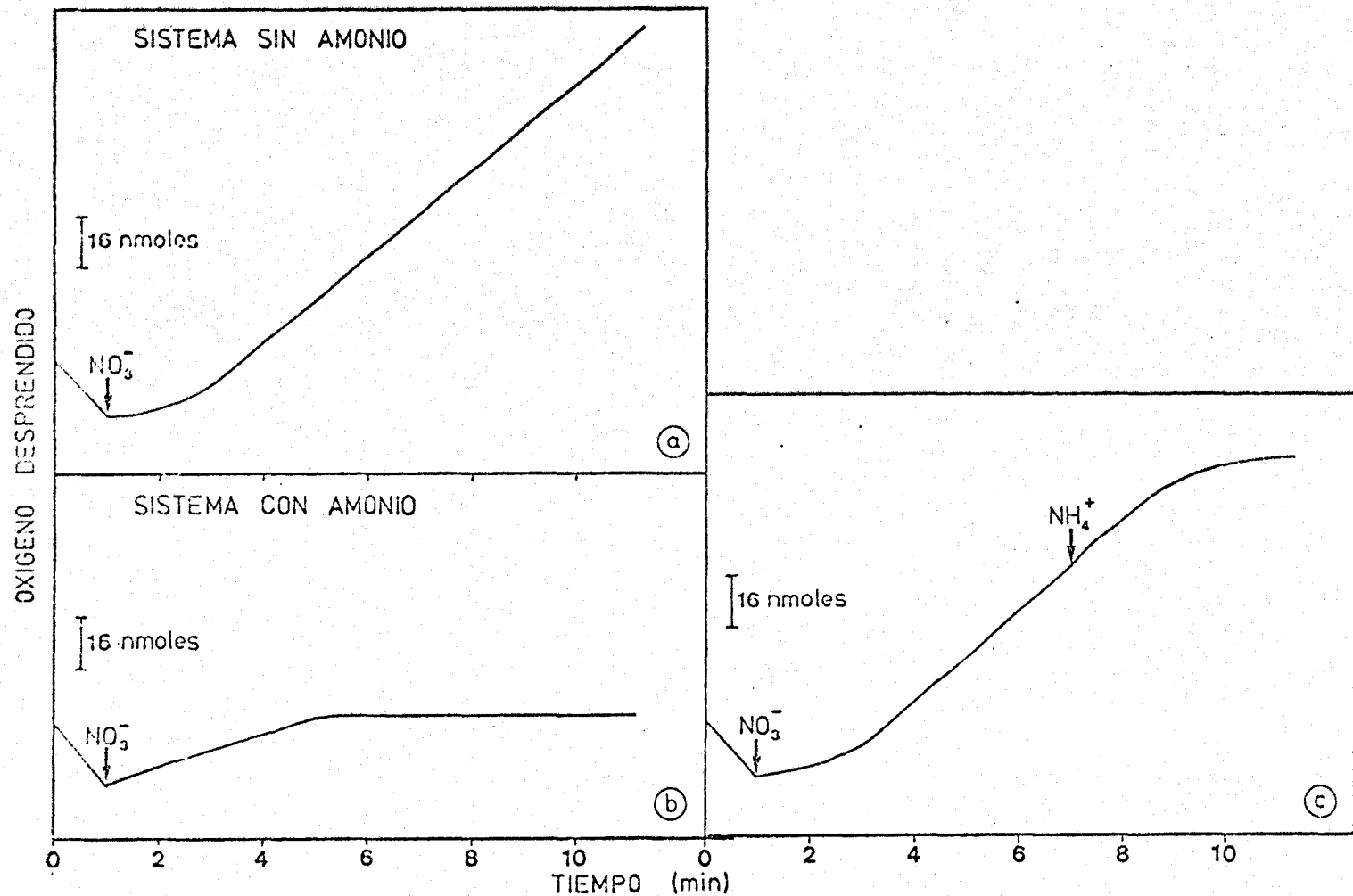


Fig. 12. *Inhibición por amonio de la reducción fotosintética de nitrato en Nostoc muscorum.* La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 3 ml: 150 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 30 μ moles de Cl_2Mg ; 0,3 mg de ferredoxina de *N. muscorum* y partículas C de *N. muscorum* conteniendo 50 μ g de clorofila. Donde se indica se añadieron 120 μ moles de NO_3K y 30 μ moles de ClNH_4 . La reacción fue a 30°C a la luz en la célula de un electrodo de oxígeno.

C.2.5. *Efecto del amonio en la fotorreducción de nitrato y de NADP⁺*

Contrariamente al efecto inhibitor del amonio sobre la fotorreducción del nitrato (Tablas XVI y XVII), la cantidad de NADPH formado por fotorreducción de NADP⁺ en presencia de amonio revela que este compuesto no inhibe la formación de NADPH dependiente de ferredoxina sino que más bien produce un ligero estímulo (Tabla XX).

C.2.6. *Fotorreducción de ferricianuro en presencia y ausencia de amonio*

El desprendimiento de oxígeno acoplado a la reducción fotosintética de ferricianuro es proporcional al tiempo y el amonio no inhibe sino que estimula ligeramente dicho desprendimiento de oxígeno (Fig. 13).

C.2.7. *Inhibición de la reducción fotosintética de NADP⁺ en presencia y ausencia de amonio*

El desprendimiento fotosintético de oxígeno en partículas de N. muscorum por adición de NADP⁺ no es directamente proporcional al tiempo sino que se va inhibiendo lentamente a lo largo de la reacción (Fig. 14a). La presencia de amonio estimula inicialmente el desprendimiento fotosinté-

TABLA XX

EFFECTO DEL AMONIO EN LA FOTORREDUCCION DE NITRATO Y NADP⁺ POR PARTICULAS DE Nostoc muscorum

Sistema de reacción	Nitrito formado (nmoles)	NADPH formado (nmoles)
Sistema del nitrato		
completo	177	-
más amonio	17	-
Sistema del NADP ⁺		
completo	-	118
más amonio	-	137

El sistema completo contenía, en un volumen de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 7,7; 10 μ moles de Cl_2Mg ; 2 μ moles de ADP; 2 μ moles de PO_4HK_2 ; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum y partículas B de N. muscorum conteniendo 26 μ g de clorofila; 40 μ moles de NO_3K o 0,1 μ mol de NADP⁺ y, donde se indica, 10 μ moles de $ClNH_4$. La reacción se llevó a cabo a 30°C a la luz durante 20 min. El nitrito y NADP⁺ formados se analizaron como se indica en Materiales y Métodos.

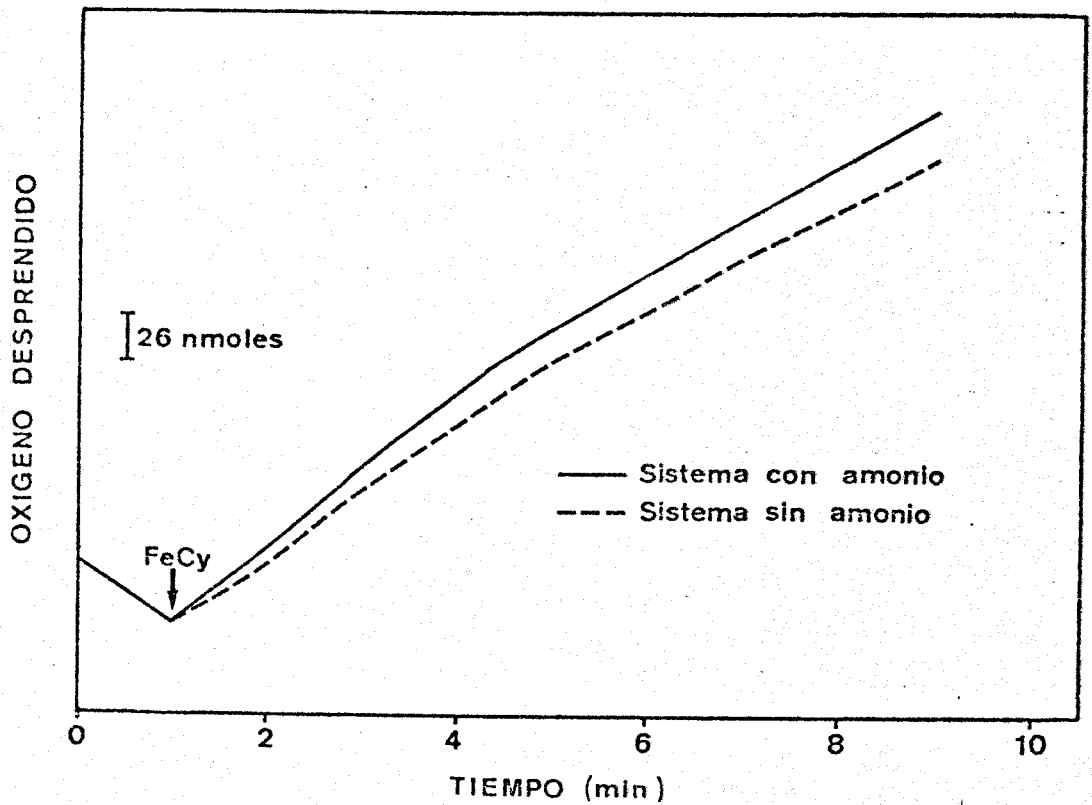


Fig. 13. Fotorreducción de ferricianuro en presencia y ausencia de amonio en *Nostoc muscorum*. Las condiciones experimentales fueron las mismas que las de la Fig.12, excepto que se omitió la ferredoxina y el nitrato se sustituyó por 14 μ moles de ferricianuro potásico.

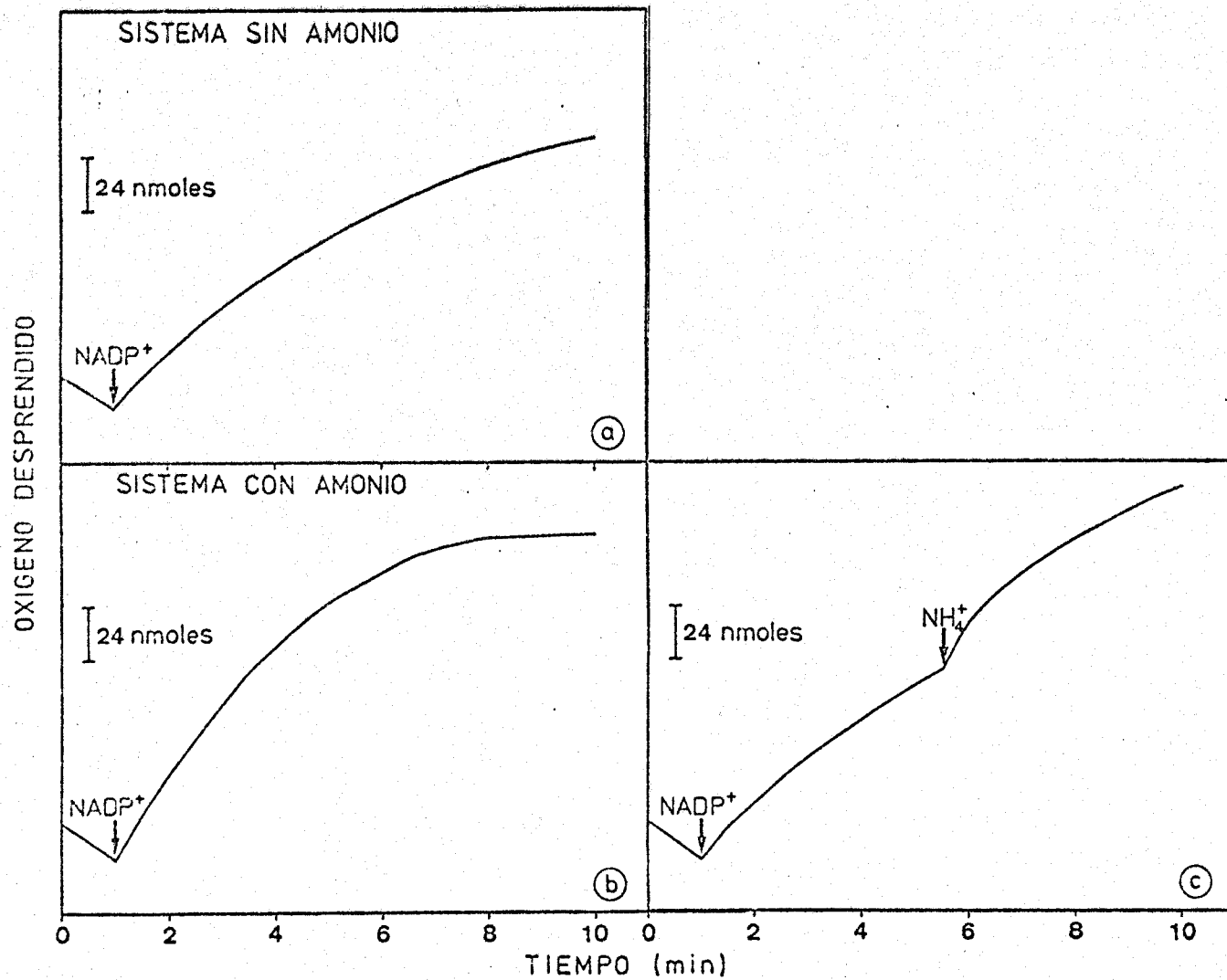


Fig. 14. Inhibición de la reducción fotosintética de NADP^+ en presencia y ausencia de amonio en *Nostoc muscorum*. Las condiciones experimentales fueron como las descritas en la leyenda de la Fig. 12, excepto que se sustituyó el nitrato por 4 μmoles de NADP^+ .

tico de oxígeno acoplado a la reducción de NADP^+ (Fig. 14b), pero posteriormente parece estimular la inhibición que, en su ausencia, ya tiene lugar. El mismo efecto se observa cuando se añade amonio a la reacción de fotorreducción de NADP^+ , una vez comenzada (Fig. 14c).

D. INTERCONVERSION METABOLICA DE LA FERREDOXINA NADP-REDUCTASA DE Nostoc muscorum

D.1. Inactivación de la ferredoxina NADP-reductasa por reducción por luz y NAD(P)H

Cuando partículas de N. muscorum tipo B se preincubaban en la luz y en la oscuridad en presencia y ausencia de NAD(P)H, la luz por sí misma y el NADPH así como el NADH causan una inactivación de la NADP-reductasa siendo mayor el nivel de inactivación por piridín-nucleótido reducido cuando el reductor es NADPH (Tabla XXI).

D.2. Reactivación por oxidación con NADP^+ o ferricianuro de la NADP-reductasa inactivada por NADPH

Como se observa en la Tabla XXII, la NADP-reductasa previamente inactivada por NADPH puede ser reactivada por oxidación mediante tratamiento con ferricianuro o NADP^+ .

TABLA XXI

INACTIVACION DE LA FERREDOXINA-NADP REDUCTASA DE
Nostoc muscorum POR REDUCCION CON LUZ Y NAD(P)H

Sistema inactivante	Actividad relativa (%)
Control (oscuridad)	100
Control (luz)	80
NADPH (oscuridad)	58
NADPH (luz)	40
NADH (oscuridad)	78

La mezcla de preincubación contenía, en un volumen final de 1 ml: 50 μ moles de Tricina-KOH, pH 8,0; 10 μ moles de Cl_2Mg ; 0,1 mg de ferredoxina de N. muscorum; partículas B de N. muscorum conteniendo 20 μ g de clorofila, y, donde se indica, 0,5 μ moles de NADPH o NADH. La preincubación se llevó a cabo a la luz a 30°C durante 20 min. Al cabo de este tiempo, se tomaron alícuotas de 0,1 ml y se analizó su actividad ferredoxina-NADP reductasa como se indica en Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a la reducción de 6,6 nmoles de citocromo c por min.

TABLA XXII

REACTIVACION DE LA FERREDOXINA-NADP REDUCTASA REDUCIDA DE
Nostoc muscorum POR OXIDACION CON NADP⁺ O FERRICIANURO

Adición	Actividad específica relativa (%)
Ninguna	42
NADP ⁺	92
Ferricianuro	110

Los extractos crudos de N. muscorum conteniendo 2 mg de proteína se preincubaron en un volumen final de 5 ml con 500 μ moles de Tris-ClH, pH 8,0 y 2,5 μ moles de NADPH. Después de 20 min a temperatura ambiente, se añadieron a alícuotas de 0,5 ml de las mezclas de preincubación, 1 μ mol de NADP⁺ o 0,5 μ moles de ferricianuro potásico. Transcurridos 10 min a temperatura ambiente (NADP⁺) ó 3 min a 0-4°C (ferricianuro), las alícuotas se pasaron por columnas de Sephadex G-25, previamente equilibradas con Tris-ClH 50 mM, pH 8,0, con objeto de eliminar el exceso de oxidante. La actividad ferredoxina-NADP reductasa se determinó a continuación como se describe en Materiales y Métodos. Las actividades se expresan como porcentajes de la actividad del control preincubado en ausencia de NADPH y filtrado por Sephadex G-25 en las mismas condiciones. El 100% de actividad corresponde a la reducción de 420 nmoles de citocromo c por min y por mg de proteína.

D.3. Protección de la ferredoxina NADP-reductasa frente a la inactivación por NADPH

La inactivación producida por el NADPH en la ferredoxina NADP-reductasa puede ser evitada por la forma oxidada de varios de sus coenzimas o cofactores fisiológicos, especialmente el NADP^+ y FAD (Tabla XXIII).

TABLA XXIII

PROTECCION DE LA FERREDOXINA-NADP REDUCTASA DE Nostoc muscorum
FRENTE A LA INACTIVACION POR NADPH

Adición	Actividad específica relativa (%)
Ninguna	100
NADPH	46
NADPH, NADP ⁺	107
NADPH, NAD ⁺	54
NADPH, FAD	130
NADPH, ferredoxina	83

La mezcla de preincubación contenía, en un volumen final de 1 ml: 100 μ moles de Tris-ClH, pH 8,0; extracto crudo de N. muscorum conteniendo 0,53 mg de proteína y, donde se indica, 0,5 μ moles de NADPH; 2 μ moles de NADP⁺ ó NAD⁺; 20 μ moles de FAD o 0,15 mg de ferredoxina de N. muscorum. Después de 20 min a temperatura ambiente, se tomaron alícuotas de 0,5 ml y se pasaron por columnas de Sephadex G-25, equilibradas con Tris-ClH 50 mM, pH 8,0. La actividad ferredoxina-NADP reductasa se determinó como se indica en Materiales y Métodos. El 100% de actividad corresponde a 260 nmoles de citocromo c reducido por min y por mg de proteína.

IV DISCUSSION

Los resultados descritos permiten esclarecer el problema del origen fotosintético del poder reductor para la asimilación de nitrato en bacterias verde-azuladas, confirman el carácter interconvertible de la nitrato reductasa de organismos fotosintéticos y establecen sobre sólidas bases el mecanismo de la inactivación in vivo por amonio de este enzima. Además, demuestran por vez primera que la ferredoxina-NADP reductasa, enzima clave de la fotosíntesis, es un enzima interconvertible por oxidación-reducción.

Al igual que en otras bacterias verde-azuladas (5,8), la nitrato reductasa de Nostoc muscorum se encuentra asociada a partículas (Tabla I).

Los piridín-nucleótidos reducidos no son buenos donadores de electrones para la nitrato reductasa de N. muscorum (Tabla II). Un hecho similar ha sido observado en A. nidulans (42). Estos resultados, sin embargo, están en desacuerdo con lo encontrado en A. cylindrica donde el NADH es capaz de reducir enzimáticamente el nitrato en partículas obtenidas con acetona (22). Cuando las partículas de Anabaena se obtuvieron por sonicación no se observó actividad de reducción de nitrato con NADH lo que induce a pensar que en estas bacterias existe una actividad NADH-diaforasa que conecta

con la nitrato reductasa y que puede estar presente o ausente dependiendo de las condiciones de aislamiento de las partículas.

Al igual que en otros organismos procarióticos conocidos (18,21,42,65), los flavín nucleótidos reducidos químicamente con ditionito fueron prácticamente incapaces de reducir enzimáticamente el nitrato con partículas de N. muscorum. La ferredoxina, reducida de la misma forma, se comportó similarmente. El metil-viológeno reducido químicamente con ditionito es donador eficaz de electrones para la reducción enzimática de nitrato a nitrito (Tablas II y III). El pH óptimo de esta reacción enzimática, sorprendentemente, es 10,5 (Fig. 1). Un valor análogo ha sido encontrado para la misma reacción en A. nidulans (42). La velocidad de la reacción enzimática fue proporcional al tiempo sólo durante los primeros ocho minutos (Fig. 4). Esta inactivación en el ensayo ha sido observada también en A. nidulans (42) y en las bacterias no fotosintéticas A. chroococcum (18) y A. calcoaceticus (65) y es debida como discutiremos posteriormente a una reducción del enzima.

Aunque los piridín-nucleótidos reducidos son ineficaces donadores de electrones, sin embargo, en presencia de metil-

viológeno, el NADPH y, en mucho menor grado, el NADH son capaces de donar los electrones en la reacción enzimática (Tabla I) lo cual indica la existencia de una diaforasa en las partículas de N. muscorum.

Las partículas de Anabaena reducen nitrato con NADPH y ferredoxina (22). Las partículas de N. muscorum se comportan de una forma similar (Tabla VI). Por ello se puede concluir la existencia en N. muscorum de una actividad NADP-reductasa asociada a partículas que media el transporte de electrones entre el NADPH y la ferredoxina. Como además, las partículas de N. muscorum son capaces de fotoreducir el nitrato hasta nitrito en una reacción dependiente de ferredoxina con intervención del fotosistema I (Tabla VII), hecho ya observado en A. cylindrica (22) y A. nidulans (42), podemos concluir que en N. muscorum, la ferredoxina reducida es el donador fisiológico inmediato de electrones en la reducción enzimática del nitrato.

La ausencia de una actividad piridín nucleótido reductasa así como su dependencia de ferredoxina reducida, asemeja la nitrato reductasa de Nostoc al enzima de bacterias (12,18,44,63,65) y la distingue claramente del complejo enzimático responsable de la reducción de nitrato

en organismos eucarióticos (8,20,25,35).

El origen del poder reductor usado en algas verdes y plantas superiores para asimilar nitrato es un problema aún no resuelto satisfactoriamente. Mientras algunos autores defienden que la nitrato reductasa se encuentra localizada en los cloroplastos y relacionada, por consiguiente, de forma directa con la fotosíntesis (13,49,52,53), otros sostienen que la nitrato reductasa es un enzima citoplásmico (30) y relacionada sólo indirectamente con la fotosíntesis (54) o bien que se encuentra en los peroxisomas y quizás se conecta con la fotosíntesis o fotorrespiración (27,39,40). Como muestran los resultados de este trabajo, las partículas de N. muscorum fotorreducen el nitrato hasta nitrito en una reacción enzimática dependiente de ferredoxina con intervención del fotosistema I (Tabla VII). Lo mismo se ha observado en A. cylindrica (22) y A. nidulans (42) lo cual apunta a una estrecha conexión entre la fotosíntesis y la reducción enzimática de nitrato.

Las partículas de N. muscorum obtenidas por sonicación en un medio estabilizante llevan a cabo a la luz

una reducción de nitrato dependiente de ferredoxina (cfr. III.B). La inhibición por CMU de la fotorreducción de nitrato así como del desprendimiento estequiométrico de oxígeno acoplado a dicha fotorreducción, demuestran que los electrones originados por la fotólisis del agua en el fotosistema II son transportados por el fotosistema I y usados en la reducción enzimática de nitrato dependiente de ferredoxina. Como estas partículas sólo necesitan la adición de ferredoxina para fotorreducir el nitrato se puede pensar que este sistema es el que interviene en el proceso fisiológico en contraposición con el sistema reconstituido usado en estudios de fotorreducción de nitrato con cloroplastos a los que fue necesario adicionar nitrato reductasa y NADP-reductasa (49). Se puede, pues, concluir que en bacterias verde-azuladas el poder reductor necesario para la asimilación de nitrato es de origen fotosintético.

La regulación de la nitrato reductasa de organismos fotosintéticos, tanto a nivel de síntesis como de actividad, es uno de los problemas de la reducción asimilatoria del nitrato más candentes y aún no totalmente resuelto.

En algas verdes, se ha descrito la nitrato reductasa como un enzima sujeto a represión por amonio (24,33,62). En bacterias verde-azuladas, Hattori ha propuesto que el nitrato es el inductor de la nitrato reductasa de A. cylindrica (45). Sin embargo, los estudios realizados con A. nidulans han demostrado que el amonio es el represor nutricional de la nitrato reductasa (42).

La nitrato reductasa de la bacteria verde-azulada N. muscorum, como se deduce de los resultados presentados en este trabajo, es un enzima que se reprime por amonio puesto que sus niveles de actividad descienden considerablemente en presencia de amonio o de nitrato y nitrito amónicos (Tabla V).

La regulación de la actividad nitrato reductasa ha sido recientemente objeto de una sostenida controversia habiéndose propuesto diversas hipótesis para explicar un posible mecanismo que interpretase coherentemente los resultados encontrados en diferentes organismos.

En 1970, se observó en nuestro Departamento de Sevilla que la adición de amonio a un cultivo de células de Chlorella fusca creciendo en nitrato producía una rápida inactivación reversible de la segunda mitad del complejo nitrato re-

ductasa, la actividad $\text{FMNH}_2\text{-NO}_3$ Rasa (33). Las células de Chlamydomonas reinhardi, en las mismas condiciones, presentaron el mismo efecto (24). Se encontró que el enzima inactivado estaba reducido ya que podía ser reactivado por oxidación con ferricianuro (24). Los resultados in vivo y la inactivación reversible in vitro del enzima por reducción, potenciada por ADP (41), se explicaron mediante una hipótesis unitaria según la cual el amonio in vivo produce en la célula fotosintética un efecto desacoplante con aumento concomitante de poder reductor y ADP que serían los inmediatos inactivantes de la nitrato reductasa en estos organismos.

El grupo de Berlin ha propuesto una hipótesis alternativa para el proceso de inactivación reversible in vivo de la nitrato reductasa de algas verdes. El poder reductor y cianuro, generado en la célula a partir de precursores cianogénicos por rutas metabólicas intrincadas, inactivan la nitrato reductasa por unión del cianuro al enzima reducido en ausencia de nitrato. La reactivación se produce cuando se oxida el enzima y el cianuro se separa del mismo. El nitrato mantiene el enzima en forma oxidada activa. La inactivación de la nitrato reductasa producida por la adición de amonio se debe, según el mismo grupo, a que el amonio impide la entrada de nitrato en la célula. La ausencia de nitrato

to establece así las condiciones para que tenga lugar la inactivación por el poder reductor y cianuro intracelulares (37,51,60).

El fenómeno de interconversión metabólica entre una forma activa y una inactiva parece ser una propiedad general de las nitrato reductasas más que una particularidad de las de células fotosintéticas ya que se ha observado también en los correspondientes enzimas de las levaduras Hansenula anomala (50) y Torulopsis nitratophila (55).

Las evidencias respecto a la regulación del sistema asimilador de nitrato en organismos procarióticos son escasas. Estudios realizados in vitro en las bacterias Azotobacter chroococcum (18) y Acinetobacter calcoaceticus (65) indican que la nitrato reductasa se inactiva en presencia de ditionito y bajas concentraciones de nitrato y que el metil-viológeno y el cianato protegen de dicha inactivación. Además, el cianato es capaz de reactivar el enzima inactivo. Resultados posteriores en A. chroococcum han permitido sugerir que el requerimiento de nitrato para la inactivación por ditionito podía ser debido a que el nitrato provoca un cambio conformacional ya que, si el enzima se precalentaba, el ditionito sólo llevaba a cabo una

inactivación de las mismas características que la producida por ditionito en presencia de nitrato (64).

La nitrato reductasa de N. muscorum se inactiva por ditionito. Esta inactivación no requiere la presencia de concentraciones bajas de nitrato ni tampoco un precalentamiento del enzima como ha sido descrito en bacterias (18, 64, 65). Sin embargo, el efecto protector del cianato y metil viológeno frente a la inactivación por ditionito es similar al observado en bacterias. La ferredoxina también protege la nitrato reductasa de N. muscorum frente a la inactivación por ditionito (Tabla XI). La inactivación producida por ditionito en la nitrato reductasa de N. muscorum se revierte por tratamiento con ferricianuro (Tabla XII). Este hecho hace pensar que la inactivación producida por ditionito es debida a una reducción del enzima. La protección ejercida por el metil viológeno y /o ferredoxina frente a la inactivación de la nitrato reductasa durante la preincubación con ditionito es difícil de interpretar. Una explicación posible es que el metil viológeno desvía los electrones del ditionito química o enzimáticamente protegiendo parcialmente contra la inactivación. Esta interpretación no parece satisfactoria para explicar la pro-

tección por ferredoxina dado que, como discutiremos posteriormente, la ferredoxina es capaz de actuar como transportador en la inactivación por reducción de la nitrato reductasa con sistemas reductores más fisiológicos. El hecho de que la ferredoxina ejerza el mismo efecto protector que el metil viológeno frente a la inactivación de la nitrato reductasa por ditionito hace pensar que tanto la ferredoxina como el metil viológeno pueden haber formado con el enzima un complejo resistente a la acción inactivante del ditionito. Quedaría aun por explicar el que, tanto en A. nidulans (42) como en N. mus- (Tabla II), la ferredoxina reducida con ditionito no actúa como donador de electrones en la reducción enzimática del nitrato. Este hecho, un tanto sorprendente, podría ser debido a que el ditionito ha afectado a la ferredoxina hasta el punto que impide que funcione como donador en la reacción enzimática pero no la incapacita para proteger eficazmente al enzima frente a la acción inactivante del ditionito. Esto no estaría en contradicción con el hecho de que la inactivación de la nitrato reductasa de Nostoc por la luz y por el sistema NADPH/NADP-reductasa es dependiente de ferredoxina. El flujo fotosintético de electrones y el NADPH, incapaces de dar directamente a la nitrato reductasa los equivalentes de poder reductor necesarios para reducir el nitrato, requieren la presencia de ferredoxina para reducir al enzima. Así, en au-

sencia de nitrato, sobreviene una reducción del enzima mediada por ferredoxina, que convierte a aquélla en su forma inactiva (cfr. III.C.1). El flujo de electrones y el sistema NADPH/NADP-reductasa, por otra parte, reducirían la ferredoxina capacitándola para que actúe como inmediato donador en el proceso enzimático de reducción del nitrato. El efecto protector del cianato podría ser debido a que éste se une al enzima manteniéndolo en su forma oxidada. Estos datos demuestran la interconversión por oxido-reducción, in vitro, de la nitrato reductasa de N. muscorum.

Los resultados in vitro nos llevaron a realizar experimentos más fisiológicos. La preincubación de partículas de Nostoc con ferredoxina reducida y en ausencia de nitrato provoca una inactivación de la nitrato reductasa. Dicha inactivación tiene lugar tanto si la ferredoxina se reduce en la oscuridad por el sistema NADPH/NADP-reductasa (Tabla XIII) como si se reduce a la luz con el fotosistema I (Tabla XIV). El tratamiento con ferricianuro del enzima inactivado en estas condiciones revierte el enzima a su forma activa, al igual que cuando el enzima se inactiva con ditionito sólo. La inactivación por el donador fisiológico de electrones (en ausencia de nitrato) así como la reversión por ferricianuro de dicha inactivación permite establecer una semejanza entre la nitrato reductasa de la bacteria ver-

de-azulada N. muscorum y la de organismos eucarioticos (36, 26, 50, 55).

Al preincubar particulas de Nostoc con actividad fotosintética desde agua, a la luz, en ausencia de nitrato, se observa una inactivación de la nitrato reductasa (Tabla XV). El proceso de inactivación depende del poder reductor fotosintético ya que no ocurre cuando se añade un inhibidor del flujo no cíclico, CMU, o cuando se omite la ferredoxina que actúa como transportador de electrones entre las partículas iluminadas y el enzima. El nitrato protege la nitrato reductasa de dicha inactivación por la luz así como de la inactivación dependiente de ferredoxina operada por el sistema NADPH/NADP-reductasa (Tabla XIII), mientras que es inefectivo frente a la inactivación producida por ditionito (Tabla XI). Estos resultados sugieren que el mecanismo de inactivación de la nitrato reductasa por reducción química por ditionito es diferente del de la inactivación, a través de la ferredoxina, por otros sistemas más fisiológicos.

El oxígeno que anteriormente había sido descrito como reactivador de la nitrato reductasa de Chlorella vulgaris (26), revierte la nitrato reductasa de N. muscorum inactivada por poder reductor fotosintético lo que indica que el enzima inactivo se encuentra en su estado reducido.

Como queda dicho anteriormente, el mecanismo de la acción inactivante del amonio sobre la actividad nitrato reductasa de células fotosintéticas ha sido interpretado en términos de dos hipótesis alternativas. Mientras Losada y col. sugieren que la inactivación observada in vivo por la adición de amonio es debida a su efecto desacoplante de la fotofosforilación aumentando así los niveles intracelulares de piridin nucleótidos reducidos y ADP, agentes inactivantes de la nitrato reductasa, el grupo de Vennesland propone que el amonio impide la entrada de nitrato en la célula lo que favorece la reducción del enzima y su unión con el cianuro. Por ello, a la vista de estas hipótesis contrapuestas, pareció interesante estudiar el proceso de inactivación por amonio a nivel subcelular a fin de poder interpretar la inactivación por amonio de la nitrato reductasa en organismos fotosintéticos. Como la nitrato reductasa de N. muscorum es un enzima particulado interconvertible por oxido-reducción (cfr. III.C.1) que media la foto-reducción del nitrato dependiente de ferredoxina con agua como donador de electrones (cfr. III.B), las partículas de esta bacteria fotosintética ofrecían un material idóneo para estudiar a nivel subcelular el posible papel del amonio en la inactivación de la nitrato reductasa.

El amonio que por sí mismo no tiene ningún efecto en

la actividad de la nitrato reductasa ensayada en la oscuridad con metil viológeno reducido con ditionito o NADPH/ferredoxina NADP-reductasa, inhibe drásticamente la reducción fotosintética de nitrato (Tabla XVI). El arseniato y la metilamina, conocidos desacoplantes de la fotofosforilación en cloroplastos (19, 32), se comportan de forma similar al amonio, inhibiendo la fotorreducción del nitrato (Tabla XVII). Por otro lado, la mezcla fosforilante, estimulante del flujo fotosintético de electrones (18), ejerce un efecto inhibitor en la fotorreducción del nitrato (Tabla XVIII). Estos resultados parecen indicar que la inhibición producida por el amonio en la fotorreducción de nitrato en partículas de N. muscorum es debida a su efecto desacoplante de la fotofosforilación y al consiguiente estímulo del flujo de electrones no cíclico lo cual provoca una sobrecarga de poder reductor que reduce la nitrato reductasa a través de ferredoxina dando lugar a su inactivación. Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados del desprendimiento fotosintético de oxígeno acoplado a la fotorreducción de nitrato. La inhibición por amonio de la fotorreducción de nitrato va acompañada de una disminución paralela del desprendimiento de oxígeno (Tabla XIX y Fig. 12).

Para excluir la posibilidad de que el amonio produjese una inhibición del propio flujo fotosintético de electrones se usó el ferricianuro como reactivo de Hill. La presencia de amonio estimula ligeramente la fotorreducción de ferricianuro (Fig. 13). Sin embargo, como el ferricianuro puede aceptar electrones tanto del fotosistema I como del fotosistema II (7), no se podía excluir que el amonio inhibiese el flujo de electrones entre los dos fotosistemas, y el ferricianuro estuviese aceptando los electrones del fotosistema II. Por ello se estudió el efecto del amonio en la fotorreducción de NADP^+ , comparándolo con el efecto que ejerce en la fotorreducción de nitrato. Los resultados revelan que el amonio no afecta prácticamente la fotorreducción de NADP^+ , sino que la estimula ligeramente (Tabla XX).

El desprendimiento fotosintético de oxígeno acoplado a la fotorreducción de NADP^+ no es proporcional al tiempo existiendo una inhibición (Fig. 14a). La adición de amonio estimula inicialmente el desprendimiento de oxígeno, aunque posteriormente dicho desprendimiento también resulta inhibido (Fig. 14b, c). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos analizando el NADPH formado (Tabla XX), ya que los análisis se realizaron a tiempos largos con lo que probablemente ya se había detenido la fotorreducción de NADP^+ , y la cantidad de NADP^+ reducido en presencia y

ausencia de amonio era prácticamente la misma. Se puede, pues, concluir que el amonio inicialmente produce un aumen to del flujo no cíclico de electrones. Nosotros interpreta mos que este aumento del flujo provoca una inactivación de la nitrato reductasa, lo cual explica la inhibición por amo nio de la fotorreducción de nitrato. El ADP que por si mis mo no tiene ningún efecto en la fotorreducción de nitrato (Tabla XVIII), cuando está con el amonio potencia la inacti vación producida por éste. Basándonos en los resultados ob tenidos en Chlorella fusca (41), este efecto del ADP se pue de interpretar como un efecto cooperativo de la forma des cargada de nucleótido con el acúmulo de poder reductor pro movido por el desacoplamiento por amonio de la fotofosfori lación. Sin embargo, son necesarios estudios posteriores pa ra la confirmación plena de esta hipótesis. Estos resulta dos y su interpretación están en desacuerdo con la hipóte sis de Vennesland según la cual la inactivación de la ni trato reductasa de Chlorella (2,51) observada al añadir amonio se debe a que este compuesto impide la entrada de nitrato en la célula creando las condiciones necesarias (poder reductor y unión del enzima reducido al cianuro) para que, al excluir el amonio al nitrato, tenga lugar la inactivación de la nitrato reductasa. La posibilidad de la exclusión del nitrato por el amonio en las partículas de N. muscorum se puede eliminar ya que el efecto inhibitor

del amonio en la fotorreducción del nitrato se observa tanto si está presente el amonio desde el comienzo de la reacción (Fig. 12b) como si se adiciona una vez comenzada ésta (Fig. 12c). En consecuencia, estos resultados apoyan abiertamente la hipótesis de Losada sobre la inactivación de la nitrato reductasa de algas verdes antes descrita (33-36).

En resumen, los resultados presentados sugieren fuertemente que la nitrato reductasa de la bacteria verde-azulada Nostoc muscorum se regula por interconversión redox. La inactivación tiene lugar por reducción, dependiente de ferredoxina, mediante el poder reductor fotosintético. El nitrato mantiene al enzima en su forma oxidada, activo. El amonio, al producir un desacoplamiento de la fotofosforilación, provoca un aumento del flujo no cíclico de electrones. Esta sobrecarga de poder reductor y, posiblemente de ADP, produce la inactivación de la nitrato reductasa en presencia del sustrato fisiológico, nitrato. Datos preliminares indican que la razón nitrato/amonio es la que gobierna el proceso redox de inactivación reversible de este enzima.

El desprendimiento de oxígeno acoplado a la fotorreducción de NADP^+ por partículas de N. muscorum se inhibe con el tiempo (Fig. 14). En principio, este hecho se podría ex-

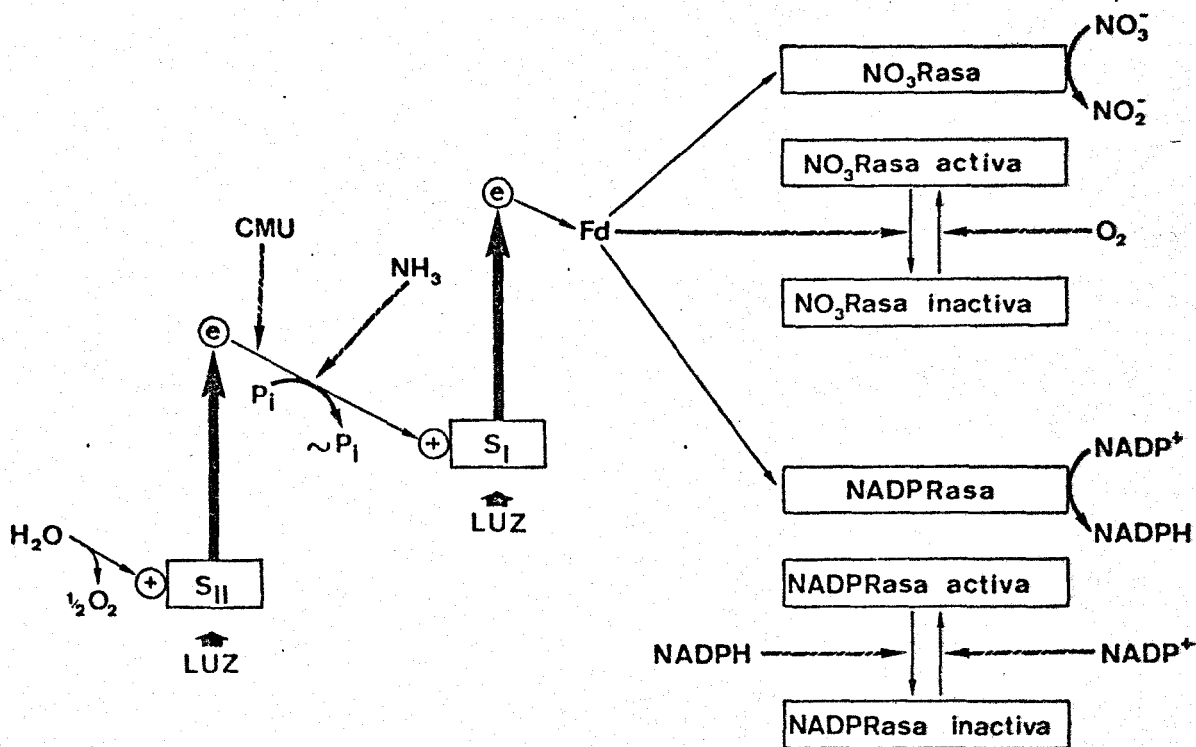
plicar en términos de inactivación de los fotosistemas por las condiciones físicas de ensayo. Sin embargo, dado que cuando se usa nitrato como reactivo de Hill, el desprendimiento de oxígeno es proporcional al tiempo (Fig. 12), esta interpretación parece poco probable. El amonio estimula inicialmente el desprendimiento fotosintético de oxígeno acoplado a la reducción de NADP^+ y posteriormente aumenta la inhibición de dicho desprendimiento (Fig. 14). Por otro lado, altas concentraciones de NADPH inhiben la reducción de nitrato dependiente de ferredoxina con el sistema NADPH/NADP-reductasa (Fig. 6). Esta inhibición no puede deberse a una inactivación de la nitrato reductasa, ya que durante el ensayo el nitrato presente protege contra la inactivación por reducción de la nitrato reductasa (Tabla XIII). Estos hechos nos hicieron pensar en la posibilidad de que la NADP-reductasa de N. muscorum, como la nitrato reductasa, fuese un enzima interconvertible por oxido-reducción que se inactiva reversiblemente por ferredoxina reducida o NADPH.

En 1966 Forti puso de manifiesto que la actividad diaforasa, pero no la citocromo f reductasa, de espinaca se inactivaba por NADPH y que el NADP^+ protegía y revertía dicha inactivación (16,67). Con estos antecedentes y a la vista de nuestros resultados, preincubamos extractos de Nostoc muscorum

con actividad ferredoxina-NADP reductasa en presencia y ausencia de NADPH encontrándose que el NADPH y, con menor eficiencia, el NADH, provocan una inactivación de la NADP-reductasa (Tabla XXI). El enzima inactivado por NADPH persiste inactivo después de remover el exceso de piridín nucleótido por filtración a través de una columna de Sephadex G-25 (Tabla XXII). El enzima inactivado por preincubación con NADPH se reactiva por tratamiento con NADP^+ o ferricianuro (Tabla XXII). Esta reactivación indica que probablemente la inactivación de la NADP-reductasa producida por el NADPH es debida a una reducción del enzima. La inactivación por NADPH se previene cuando la preincubación con los piridín nucleótidos reducidos se lleva a cabo en presencia de las formas oxidadas de sus coenzimas o cofactores fisiológicos, específicamente NADP^+ o FAD y, en menor extensión, ferredoxina (Tabla XXIII). La protección por NADP^+ puede ser debida a su unión con el enzima que la mantiene en su forma oxidada, activa. El efecto protector del FAD podría ser debido a que el flavín nucleótido oxidado es capaz de dar los electrones de la NADP-reductasa al oxígeno impidiendo así la reducción del enzima, mientras que la ferredoxina, al ser sustrato, puede actuar, al igual que el NADP^+ , uniéndose al enzima e impidiendo su inactivación por reducción. Se puede, pues, con-

cluid que la ferredoxina-NADP reductasa de N. muscorum es un enzima interconvertible por oxido-reducci3n in vitro. El caracter fisiol3gico de los compuestos que participan en el proceso de inactivaci3n reversible de la NADP-reductasa permite adem3s suponer que el mismo proceso de regulaci3n es el que opera in vivo. La inhibici3n de la reducci3n fotosint3tica de NADP⁺, aparentemente, es un proceso complejo en el que, al menos, participan tanto la regulaci3n de la NADP-reductasa como la de los fotosistemas. De hecho, Arnon y Chain han mostrado que la preincubaci3n de cloroplastos con ferredoxina y NADPH estimula la fotofosforilaci3n c3clica disminuyendo el flujo de electrones desde agua (4,5). Esta reacci3n inversa con ferredoxina y NADPH es dependiente de la ferredoxina-NADP reductasa y ya hab3a sido relacionada con la fotofosforilaci3n c3clica por Forti (17).

Los resultados previamente expuestos se pueden resumir en el siguiente esquema:



Los electrones originados por la fotólisis del agua en el fotosistema II (SII) son transportados a través del fotosistema I (SI) a la ferredoxina (Fd) la cual dona los electrones para la reducción enzimática de nitrato a nitrito mediada por la nitrato reductasa. En ausencia de nitrato la ferredoxina dona los electrones a la nitrato reductasa transformándola en su forma inactiva. El oxígeno oxida a la nitrato reductasa revirtiéndola a su forma oxidada, activa. El amonio, al producir un desacoplamiento de la fotofosfo

rilación y un aumento concomitante del flujo de electrones, provoca la conversión (en presencia de nitrato) de la forma activa, oxidada, de la nitrato reductasa en su forma inactiva, reducida.

De igual forma, los electrones originados por la fotólisis del agua en el fotosistema II son transportados a través del fotosistema I a la ferredoxina la cual dona los electrones para la reducción enzimática del NADP^+ por la NADP-reductasa. El NADPH produce una reducción de la NADP-reductasa transformándola en su forma inactiva. A su vez, el NADP^+ provoca una oxidación de la NADP-reductasa transformándola en su forma activa.

V CONCLUSIONES

- 1 Se ha demostrado que el donador de electrones inmediato de la nitrato reductasa de Nostoc muscorum es la ferredoxina reducida.
- 2 Se ha puesto de manifiesto que el poder reductor para la reducción de nitrato por la nitrato reductasa dependiente de ferredoxina de Nostoc muscorum es de origen fotosintético.
- 3 El amonio es represor nutricional de la nitrato reductasa de Nostoc muscorum.
- 4 La nitrato reductasa de Nostoc muscorum es un enzima interconvertible por oxido-reducción in vitro. Dicho enzima se inactiva reversiblemente por el flujo fotosintético de electrones a través de la ferredoxina.
- 5 El amonio inhibe la fotorreducción de nitrato por partículas de Nostoc muscorum inactivando por reducción a la nitrato reductasa debido probablemente a su efecto desacoplante.
- 6 Se ha demostrado que la NADP-reductasa de Nostoc muscorum es un enzima interconvertible por oxido-reducción in vitro.

VI BIBLIOGRAFIA

1. ARNON, D.I., *Plant Physiol.*, 24, 1 (1949)
2. ARNON, D.I., F.R. WHATLEY and B.L. ALLEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 32, 47 (1959)
3. ARNON, D.I., B.D. McSWAIN, H.Y. TSUJIMOTO and K. WADA, *Biochim. Biophys. Acta*, 357, 231 (1974)
4. ARNON, D.I. and R.K. CHAIN, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 4961 (1975)
5. ARNON, D.I. and R.K. CHAIN, *Photosynthetic Organelles Special Issue of Plant Cell Physiol.*, 129 (1977)
6. AVRON, M. and A.T. JAGENDORF, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65, 475 (1956)
7. BANASZAK, J., R. BARR and F.L. CRANE, *J. Bioenergetic*, 8, 83 (1976)
8. BEEVERS, L. and R.H. HAGEMAN, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20, 495 (1969)
9. McSWAIN, B.D., H.Y. TSUJIMOTO and D.I. ARNON, *Biochim. Biophys. Acta*, 423, 313 (1976)
10. CARDENAS, J., T. ORTEGA, J. RIVAS and M. LOSADA, 4th International Congress on Photosynthesis, Reading, U.K., Abstract pag. 61 (1977)
11. CHAPARRO, A., J.M. MALDONADO, J. DIEZ, A.M. RELIMPIO and M. LOSADA, *Plant Sci. Lett.*, 6, 335 (1976)

12. CHIBA, A. and M. ISHIMOTO, J. Biochem., 73, 1315 (1973)
13. DEL CAMPO, F.F., A. PANEQUE, J.M. RAMIREZ and M. LOSADA, Biochim. Biophys. Acta, 66, 450 (1963)
14. DUGGAN, J.X. and L.E. ANDERSON, Planta, 122, 293 (1975)
15. FORTI, G. and G. ZANETTI, Biochem. Chloroplasts, 2, 523 (1966)
16. FORTI, G. and E. STURANI, Eur. J. Biochem., 3, 461 (1967)
17. FORTI, G. and L. ROSA, En: Proc. 2nd Int. Congr. Photosynthesis, (Forti, G., Avron, M., Melandri, A., eds), Dr. W. Junk, N.V., The Hague, pag. 1261 (1972)
18. GUERRERO, M.G., J.M. VEGA, E. LEADBETTER and M. LOSADA, Arch. Mikrobiol., 91, 287 (1973)
19. GOOD, E.N., Biochim. Biophys. Acta, 40, 502 (1960)
20. HAGEMAN, R.H. and D.P. HUCKLESBY, Methods in Enzymology, (San Pietro, A., ed) New York, Academic Press, vol 23 A, pag. 491 (1971)
21. HATTORI, A. and J. MYERS, Plant & Cell Physiol., 8, 327 (1967)
22. HATTORI, A. and I. UESUGI, Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis (Shibata, K., Takamiya, A., Jagendorf, A.T., Fuller, R.C., eds) University of Tokio Press, pag. 201 (1968)

23. HATTORI, A., Plant & Cell Physiol., 11, 975 (1970)
24. HERRERA, J., A. PANEQUE, J.M. MALDONADO, J.L. BAREA and M. LOSADA, Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 996 (1972)
25. HEWIT, E.J., Annu. Rev. Plant. Physiol. 26, 73 (1975)
26. JETSCHMAN, K., L.P. SOLOMONSON and B. VENNESLAND, Biochim. Biophys. Acta, 309, 32 (1973)
27. KAGAN-ZUR, V. and S.H. LIPS, Eur. J. Biochem. 59, 17 (1975)
28. KEISTER, D.L., A. SAN PIETRO and B. PARISI, J. Biol. Chem. 235, 2989 (1960)
29. KESSLER, E. and H. OESTERHELD, Nature, 228, 287 (1970)
30. KLEPPER, L., D. FLESHER and R.H. HAGEMAN, Plant Physiol., 48, 580 (1971)
31. KNUTSEN, G., Biochim. Biophys. Acta, 103, 495 (1965)
32. LOSADA, M. and D.I. ARNON, Metabolic Inhibitors (Hochster, R.M., Quastel, J.H. eds.) Academic Press, New York vol 11, pag. 559 (1963)
33. LOSADA, M., A. PANEQUE, P.J. APARICIO, J.M. VEGA, J. CARDENAS and J. HERRERA, Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 1009 (1970)

34. LOSADA, M., En: 3th International Symposium on the Metabolic Interconversion of Enzymes, Seattle Berlin-New York: Springer, pag. 257 (1974)
35. LOSADA, M., Reflections on Biochemistry (Kornberg, A., Horecker, B.L., Cornudella, L., Oró, J. eds.) Pergamon Press, Oxford, pag. 73 (1976)
36. LOSADA, M., J. Mol. Catal., 1, 245 (1976)
37. LORIMER, G.H., H.S. GEWITZ, W. VÖLKER, L.P. SOLOMONSON and B. VENNESLAND, J.Biol. Chem., 249, 6074 (1974)
38. LOWRY, O.H., M.J. ROSEBROUG, A.L. FARR, and R.J. RANDALL, J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)
39. LIPS, S.H. and Y. AVISSON, Eur. J. Biochem., 29, 20 (1972)
40. LIPS, S.H., Plant Physiol., 55, 598 (1975)
41. MALDONADO, J.M., J. HERRERA, A. PANEQUE and M.LOSADA, Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 27 (1973)
42. MANZANO, C., P.CANAU, C. GOMEZ-MORENO, A.M. RELIMPIO and M.LOSADA, Mol. Cell. Biochem., 16, 161 (1976)
43. MITSUI, A. and D.I. ARNON, Physiol. Plant, 25, 135 (1971)
44. MOLOFEEVA, I.V., E.N. KONDRATIEVA and A.R. RUBIN, FEBS LETTERS, 53, 2 (1975)

45. OHMORI, K. and A. HATTORI, *Plant & Cell Physiol.*, 11, 873 (1970)
46. ORTEGA, T., F. CASTILLO and J. CARDENAS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 885 (1976)
47. ORTEGA, T., F. CASTILLO and J. CARDENAS, XII Journées Biochimiques Latines, Bordeaux, Abstract n° 31 (1976)
48. ORTEGA, T., F. CASTILLO, J. CARDENAS and M. LOSADA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75, 823 (1977)
49. PANEQUE, A., P.J. APARICIO, J. CARDENAS, J.M. VEGA and M. LOSADA, *FEBS Letters*, 3, 57 (1969)
50. PICHINOTY, F. and G. METENIER, *Annales de l'Institut Pasteur*, 111, 282 (1966)
51. PISTORIUS, E.K., H.S. GEWITZ, H. VOSS and B. VENNESLAND, *Planta (Berl)*, 128, 73 (1976)
52. RAMIREZ, J.M., F.F. DEL CAMPO, A. PANEQUE and M. LOSADA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 297 (1964)
53. ROTHMAN, C.K.M. and U.S.R. DAS, *Can. J. Bot.*, 52, 2599 (1974)
54. RITENOUR, G.L., K.W. JOY, J. BUNING and R.H. HAGEMAN, *Plant Physiol.*, 42, 233 (1967)
55. RIVAS, J., M.G. GUERRERO, A. PANEQUE and M. LOSADA, *Plant Sci. Lett.*, 1, 105 (1973)

56. SAN PIETRO, A. and D.L. KEISTER, Arch. Biochem. Biophys., 98, 235 (1962)
57. SNELL, E.D. and C.D. SNELL, Colorimetric Methods of Analysis, D. Van Nostrand Company, Academic Press, New York, pag. 804 (1949)
58. SHIN, M., K. TAGAWA and D.I. ARNON, Biochem. Z., 338, 84 (1963)
59. SHIN, M., Methods in Enzymology (San Pietro, A., ed), Academic Press, New York, vol. 23 A, pag. 440 (1971)
60. SOLOMONSON, L.P. and A.M. SPEHAR, Nature, 265, 373 (1977)
61. SUSOR, W.A. and D.W. KROGMANN, Biochim. Biophys. Acta, 120, 65 (1966)
62. SYRETT, P.J. and C.R. HIPKIN, Planta, 111, 57 (1963)
63. TORTOLERO, M., R. VILA and A. PANEQUE, Plant. Sci. Lett., 5, 141 (1975)
64. TORTOLERO, M., Resumen de Tesis Doctoral, Publicaciones de la Universidad de Sevilla (1976)
65. VILLALOBO, A., J.M. ROLDAN, J. RIVAS and J. CARDENAS, Arch. Mikrobiol., 112, 127 (1977)
66. WESSELS, J.S.C. and R. VAN DER VEEN, Biochim. Biophys. Acta, 19, 548 (1956)
67. ZANETTI, G. and G. FORTI, J. Biol. Chem., 241, 279 (1966)

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo el Tribunal integrado por los abajo firmantes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. Eximidad Ortega Paradas
titulada "Caracterización y propiedades de la fotosíntesis
de Nitrocelo en la bacteria verde-azulada NOSTOCUM
conium."

acordó otorgarle la calificación de sobresaliente
"au laude"

Sevilla, 21 de Diciembre 1.977.

El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,



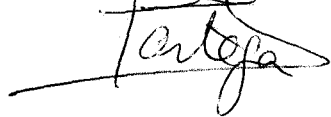
El Presidente,



El Secretario,



El Secretario,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672958