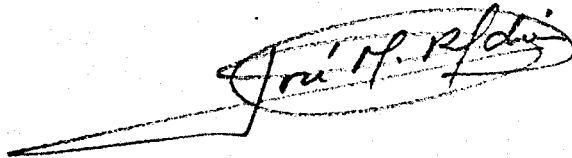


TD/494

REACTIVACION POR LUZ AZUL DE LA NITRATO REDUCTASA DE ALGAS
VERDES Y PLANTAS SUPERIORES

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA CIENCIAS
27-9-76
ENTRADA N.º 762

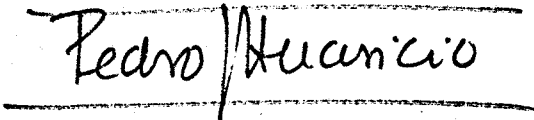
Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias por el Licenciado D. José Manuel Roldán Nogueras.



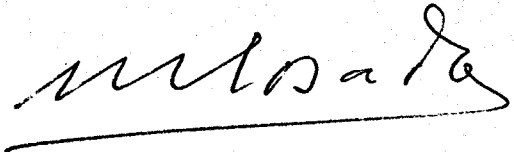
Sevilla, Septiembre, 1976

Director

Ponente



Dr. Pedro J. Aparicio Alonso
Colaborador Científico del CSIC



Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica



8 18 5511

A mis padres

A M^a José

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 profesor D. Manuel Losada Villasante por acogerme en su equipo de investigación y por su continua ayuda y labor crítica, y al Dr. D. Pedro Aparicio Alonso por la dirección de esta tesis. Con su dedicación constante me han orientado en la investigación científica y han hecho posible la realización de este trabajo.

Asímismo, deseo manifestar especial agradecimiento a mi compañero D. Fernando Calero Santiago. Su entusiasmo, abnegación y enorme capacidad de trabajo han sido un estímulo inestimable en los momentos difíciles.

Al Dr. D. Joaquín Rivas Florido que me inició en las tareas de investigación.

A los doctores D. Antonio Paneque Guerrero, D. Enrique Palacián Gil, D. Jacobo Cárdenas Torres, D. Angel M^a Relimpio Ferrer, D. Miguel García Guerrero, D. Carlos Gómez-Moreno Calera, D. Francisco de la Rosa Acosta, D. José M^a Maldonado Ruiz, D. Juan López Barea y especialmente a D. Francisco Castillo Rodríguez por su aliento y valiosa crítica.

Agradezco su ayuda a mis compañeros D. Francisco Sosa Suárez, D. Antonio Villalobo Polo, D. Jesús Díez Dapena y D. José Antonio Bárcena Ruiz.

Mi sincero agradecimiento a la Sra. Dña. M^a José Pérez de León y a la Srta. Dña. Teresa Silva Cueto por su ayuda en la confección de esta tesis, y a D. José Moreno Fernández por su continua colaboración técnica.

Asímismo, a mis hermanos Rafael, por su valiosa ayuda en la realización de fotografías y diapositivas, y Jesús, por su ayuda en la confección de este trabajo.

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	8
I. INTRODUCCION	9
II. MATERIALES Y METODOS	26
1. Materiales biológicos utilizados, obtención de extractos y purificación de la nitrato reductasa	27
1.1. <u>Spinacea oleracea</u>	27
1.2. <u>Chlorella fusca</u>	30
2. Inactivación <u>in vitro</u> de la nitrato reductasa .	36
3. Iluminación de la nitrato reductasa inactivada	37
4. Métodos analíticos	38
4.1. Determinación de proteínas	38
4.2. Ensayos enzimáticos	38
4.3. Determinaciones espectrofotométricas	39
5. Reactivos y aparatos	40
5.1. Preparación del gel de fosfato cálcico ...	40
5.2. Procedencia de los productos químicos	40
5.3. Aparatos	41
III. RESULTADOS	42
1. Caracterización del citocromo <u>b₅₅₈</u> en la nitrato reductasa de espinaca	43
1.1. Participación del citocromo <u>b₅₅₈</u> en la transferencia de electrones desde el NADH hasta el nitrato	43

2. Efecto de la luz visible sobre la actividad del enzima	46
3. Efecto de los flavín-nucleótidos en la fotorreactivación de la nitrato reductasa	50
4. Estudio del proceso de reactivación al someter la nitrato reductasa a iluminación intermitente	56
5. Fotorreactivación de la nitrato reductasa en presencia de nitrato	58
6. Efecto del pH en la fotorreactivación de la nitrato reductasa	60
7. Efecto de la temperatura en la fotorreactivación de la nitrato reductasa	62
8. Efecto de los piridín nucleótidos oxidados y adenín-nucleótidos en la fotorreactivación de la nitrato reductasa	65
9. Efecto de los piridín-nucleótidos reducidos en la fotorreactivación de la nitrato reductasa ...	69
10. Efecto del EDTA en la fotorreactivación de la nitrato reductasa	79
11. Efecto del ioduro potásico en la fotorreactivación de la nitrato reductasa	81
12. Fotorreactivación de la nitrato reductasa en presencia de amonio o formiato	84
13. Fotorreactivación de la nitrato reductasa desprovista de la actividad diaforásica por calentamiento	86

14. Fotorreactivación de la nitrato reductasa de <u>Chlorella</u>	88
IV. DISCUSION	91
V. CONCLUSIONES	110
VI. BIBLIOGRAFIA	114

ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
DCMU	3-(3'-4'-diclorofenil)-1,1-dimetilurea
DTE	2,3-dihidroxi-1,4-ditiol butano (ditioeritritol)
EDTA	Acido etilendiaminotetraacético (sal disódica)
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FMN	Flavín mononucleótido
<u>g</u>	Aceleración de la gravedad
NAD ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NAD(P)H	NADH o NADPH indistintamente
p-MB	para-mercuribenzoato
Tris	Tri-(hidroximetil)-aminometano

I INTRODUCCION

La importancia biológica del nitrógeno radica en que entra a formar parte destacada de sustancias claves de la materia viva, como son las proteínas, los ácidos nucleicos y ciertos coenzimas y metabolitos.

En la naturaleza, el nitrógeno se encuentra fundamentalmente en su estado molecular, en forma gaseosa, siendo el componente más importante, desde el punto de vista cuantitativo, de la atmósfera. Este nitrógeno pierde su carácter gaseoso bien por fijación biológica, o por reacciones puramente químicas.

La fijación biológica -que produce 175 millones de toneladas métricas al año- constituye los dos tercios del nitrógeno total fijado en nuestro planeta, mientras que la fijación industrial -concretamente en la síntesis química de fertilizantes- aporta 44 millones de toneladas métricas por año y, por último, la fijación química espontánea -debida a la formación de óxidos de nitrógeno producidos por radiaciones ultravioletas, combustiones y descargas eléctricas- da lugar a 40 millones de toneladas métricas anuales (Burns y Hardy, 1975).

Es muy reducido el número de organismos que son capaces de fijar directamente el nitrógeno atmosférico. Entre ellos se encuentran algunas bacterias -bien de vida libre, como los géneros Clostridium, Klebsiella, Chromatium, Azotobacter

y Chloropseudomonas, bien en asociación simbiótica, como el género Rhizobium y la mayor parte de las algas verde-azuladas, como son Nostoc y Anabaena entre otras.

Estos organismos fijadores reducen el nitrógeno desde su estado neutro molecular al estado de ión amonio, que utilizarán posteriormente para la síntesis de su material celular. Este ión amonio es posteriormente liberado como consecuencia de la degradación de estos organismos, lo que supone un aporte que continuamente renueva las disponibilidades de este elemento en los suelos, que soportan la vida vegetal de nuestro planeta.

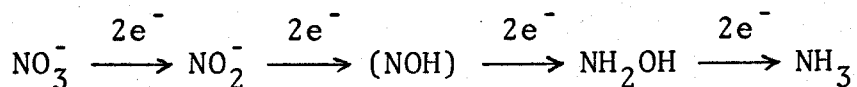
Sin embargo, la mayor parte del nitrógeno presente en los suelos se encuentra en forma de nitrato. Esto es debido al carácter aeróbico de la capa superficial de los mismos, donde dos géneros de bacterias, Nitrosomonas y Nitrobacter, por el proceso biológico de la nitrificación, oxidan el ión amonio hasta nitrato, obteniendo así la energía necesaria para sus procesos vitales.

Por ésto, a excepción de los organismos capaces de fijar directamente el nitrógeno de la atmósfera, todas las formas de vida dependen en última instancia de aquellos organismos que son capaces de asimilar el nitrato, fundamentalmente las algas verdes y plantas superiores.

De hecho, no se produce en los suelos la acumulación de compuestos oxidados de nitrógeno, que por su carácter soluble podrían constituir una de las principales fuentes de contaminación de las aguas. Además de la asimilación del nitrato por las distintas formas vegetales, en las capas profundas del suelo y por tanto en condiciones anaeróbicas, otro tipo de microorganismos, las bacterias denitrificantes, son capaces de utilizar el oxígeno de estos compuestos nitrogenados como aceptor último de electrones, devolviendo a la atmósfera el nitrógeno en su estado molecular.

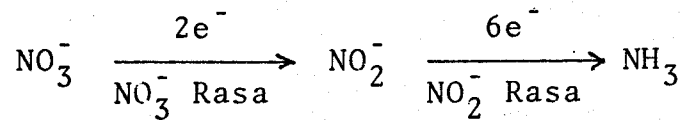
El conjunto de estas reacciones es responsable del mantenimiento del equilibrio del nitrógeno en la naturaleza.

La reacción asimilatoria del nitrato a amoníaco ha sido objeto de especial atención por los bioquímicos de todas las épocas. Meyer y Schulze, en 1894, propusieron que esta reducción ocurría en cuatro pasos distintos, en cada uno de los cuales se transferirían dos electrones al sustrato según el siguiente esquema:



Los enzimas que intervendrían en estos pasos son nitrato, nitrito, hiponitrito e hidroxilamina reductasas.

Sin embargo, estudios realizados durante los últimos años han probado que esta vía incluye solamente dos etapas catalizadas en serie por dos metaloenzimas: nitrato y nitrito reductasas (Beevers y Hageman, 1969; Hewit, 1975; Losada, 1976), siendo actualmente aceptado el siguiente esquema:



La fuente de electrones para que tenga lugar esta reacción puede ser de muy diversa naturaleza dependiendo del tipo de organismo que la realice. En el caso de los organismos fotosintéticos está demostrado que son los electrones del agua los que intervienen en este proceso.

El enzima que cataliza la reducción de nitrato a nitrito, la nitrato reductasa, en algas verde-azuladas (Hattori y Vesugi, 1968; Manzano et al., 1976) y bacterias (Gurrero et al., 1973; Chiba e Ishimoto, 1975; Tortolero et al., 1975) presenta un peso molecular de aproximadamente 100.000 daltons y contiene molibdeno como grupo prostético. Las ferredoxinas, sulfoferroproteínas solubles con potencial de óxido-reducción fuertemente electronegativo, actúan en este caso como donadores naturales de electrones.

La nitrato reductasa de hongos, algas verdes y plantas superiores es un complejo enzimático que utiliza los piridín-nucleótidos reducidos como donadores de electrones. Dependiendo de su origen, el peso molecular varía desde 160.000 daltons para el enzima de maiz (Hageman y Hucklesby, 1971) a 230.000 para el de Neurospora crassa (Garret y Nason, 1969) y 500.000 en Chlorella fusca (Zumft, 1970) y espinaca (Aparicio, 1971). En la transferencia de electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato, catalizada por la nitrato reductasa de estos organismos, actúan secuencialmente dos actividades enzimáticas diferentes. La primera es una diaforasa que contiene FAD como grupo prostético y la segunda es la molibdoproteína nitrato reductasa terminal, o nitrato reductasa propiamente dicha.

Recientemente se ha conseguido la purificación hasta homogeneidad del complejo enzimático de Chlorella vulgaris (Solomonson et al., 1975). Se ha probado la existencia de, al menos, dos moléculas de FAD, dos grupos hemínicos y dos átomos de molibdeno por cada molécula de enzima. No han podido ser detectados sulfuros lábiles ni hierro no hemínico. Estos autores, a partir de un radio de Stokes para esta proteína de 89 Å, han determinado un peso molecular de 356.000 daltons para el enzima nativo, que está a su vez

formado por tres subunidades. Los agrupamientos hemínicos se han identificado como citocromo b₅₅₈, demostrándose su intervención activa en la cadena de transporte electrónico.

Las dos porciones de la nitrato reductasa de algas verdes, hongos y plantas superiores pueden ensayarse independientemente y responden de forma específica a diferentes tratamientos e inhibidores.

Así, la mitad diaforasa toma los electrones de los piridín-nucleótidos reducidos y puede cederlos a diversos aceptores oxidados, tales como ferricianuro, DPIP y citocromo c (Paneque y Losada, 1966; Paneque et al., 1968; Aparicio, 1971). Por su parte, la nitrato reductasa terminal acepta los electrones o bien de la diaforasa, o de diversos donadores como las flavinas y viológenos reducidos (Losada et al., 1969).

La incubación del enzima a 45°C durante cinco minutos da lugar a la desaparición de la actividad diaforasa sin que la terminal se afecte en absoluto. Idéntico efecto se consigue por tratamiento con reactivos específicos del grupo sulfhidrilo como el p-mercuribenzoato. El tratamiento térmico no tiene efecto si se realiza en presencia de concentraciones catalíticas de FAD, grupo prostético del

enzima. Asimismo el NADH, en algas verdes y plantas superiores donador específico de la diaforasa, evita su inactivación por reactivos del grupo sulfhidrilo (Losada et al., 1969; Relimpio et al., 1971; Vega et al., 1972; Barea et al., 1975).

Por su parte, la actividad terminal es potentemente inhibida por cianuro, cianato, azida y carbamil-fosfato que dan lugar a una inhibición competitiva respecto al nitrato (Vega et al., 1972). No obstante, cuando el cianuro se une al enzima previamente reducido, la unión se hace más fuerte y la inhibición pasa a ser no competitiva (Relimpio et al., 1971; Vega et al., 1972; Moreno et al., 1972; Barea et al., 1975).

La nitrato reductasa ha sido descrita como un enzima interconvertible que se encuentra sometido a un mecanismo de regulación re-dox (Losada, 1973). Esta regulación se realiza específicamente en la segunda mitad del complejo, que cataliza la etapa final de la reducción del nitrato. El enzima puede existir en dos formas, una activa y otra inactiva, siendo ambas especies metabólicamente interconvertibles: la forma activa se inactiva por reducción y la forma inactiva se activa por oxidación.

El fenómeno de la interconversión del enzima se descubrió en algas verdes. La adición de amonio a un cultivo de

Chlorella (Losada et al., 1970; Maldonado et al., 1973) o Chlamydomonas (Herrera et al., 1972; Losada et al., 1973) creciendo aeróbicamente en presencia de nitrato, produjo la rápida inactivación de la nitrato reductasa terminal sin afectar en absoluto a la diaforasa. Al eliminar el amonio del medio de cultivo se consiguió en poco tiempo la reactivación del enzima. Semejantes resultados se obtuvieron en el caso del alga termofílica acidófila Cyanidium caldarium (Rigano, 1971).

En experimentos similares, la adición de arseniato al medio de cultivo provocó la inactivación de la nitrato reductasa.

Está establecido que tanto el amonio como el arseniato, aunque por mecanismos diferentes, son dos efectivos desacoplantes del flujo fotosintético de electrones (Losada y Arnon, 1963). Por otro lado está bien establecido que el flujo fotosintético de electrones aumenta cuando se encuentra desacoplado, provocando la acumulación de poder reductor y ADP en la célula. Estos datos apoyan la idea de que la inactivación del enzima se produce in vivo por sobrerreducción de la proteína.

La anterior interpretación está de acuerdo con el hecho de que las condiciones que favorecían la acumulación en la célula de poder reductor, como es la anaerobiosis, produje-

ran la inactivación de la nitrato reductasa. Por otro lado, la adición al cultivo de células de menadiona o DCMU, compuestos que impiden la reducción fotosintética de los piridín-nucleótidos, evitaba la inactivación in vivo del enzima.

La existencia de un mecanismo de regulación dependiente del nivel re-dox de la célula es corroborada por el hecho de que en todos los casos anteriores el enzima inactivado in vivo, se reactiva in vitro por la acción de un efectivo agente oxidante como es el ferricianuro.

La interconversión de la nitrato reductasa ha sido estudiada en otros organismos; en bacterias, como Azotobacter chroococcum (Guerrero et al., 1973; Vega et al., 1973) y Nitrobacter agilis (Herrera y Nicholas, 1974), en hongos (Subramanian y Sorger, 1972; Garret y Greenbaum, 1973; Wallace, 1974) y plantas superiores (Castillo et al., 1975; Orebamjo Y Stewart, 1975). En todos los casos, el nivel de poder reductor intracelular era un factor decisivo en la regulación de este enzima.

También se puede inactivar el enzima in vitro por incubación con reductores fisiológicos, como los piridín-nucleótidos reducidos, siendo el proceso reversible por tratamiento con ferricianuro. La inactivación se potencia especialmente si la incubación con piridín-nucleótidos se realiza en presencia de cianuro (Relimpio et al., 1971; Vega et al., 1972; Moreno et al., 1972).

El grupo de Vennesland ha detectado cantidades catalíticas de cianuro, al parecer equimoleculares con el enzima, en la nitrato reductasa de Chlorella, que obtienen de este organismo en su forma inactiva (Siegfried et al., 1974). Como en sus condiciones, in vitro, la intensidad de la inactivación era proporcional a la cantidad de cianuro unida al enzima previamente reducido, concluyeron que la adición de amonio a un cultivo de células da lugar, por una vía aún no establecida, a cianuro que jugaría un importante papel como agente inactivante (Lorimer et al., 1974). Para este grupo, por tanto, el cianuro juega un papel clave en la regulación de la nitrato reductasa de algas verdes. Sin embargo, estos autores no han podido demostrar la biosíntesis de cianuro por estos organismos.

Mientras que el proceso de inactivación, tanto in vivo como in vitro, de la nitrato reductasa de algas verdes y plantas superiores, esta sólidamente documentado, el mecanismo fisiológico de reactivación permanece aún por elucidar. Está, sin embargo, perfectamente establecido que la reactivación del enzima se debe a la oxidación de la proteína, hecho que se consigue in vitro al incubarla con ferric cianuro. En este trabajo, se establece que la luz azul, al actuar directamente sobre la forma inactiva de la nitrato

reductasa, es capaz de provocar su fototransformación en la forma activa del enzima.

La luz solar es la fuente básica de energía de la que depende la vida en nuestro planeta.

Esta dependencia radica especialmente en el proceso de la fotosíntesis, en el cual la luz suministra la energía necesaria para la producción, a partir de sustancias oxidadas y pobres en energía, de las moléculas orgánicas características de los organismos vivos.

Estos compuestos constituyen los nutrientes que, para completar su ciclo vital, requieren los organismos no fotosintéticos que de este modo son totalmente dependientes de la energía solar y de los organismos que la utilizan.

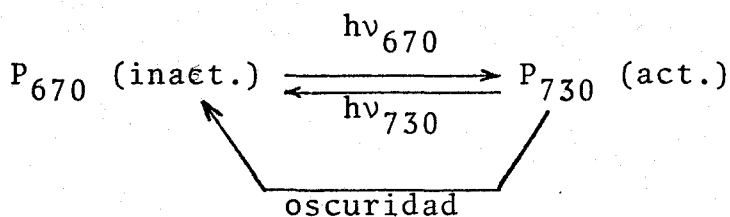
Lo que se entiende por luz es la fracción de energía radiante que es sensible al ojo humano. Mientras que la radiación energética que llena el universo presenta un amplísimo espectro, de 10^{-9} cm de longitud de onda para los rayos γ hasta kilómetros en las ondas de la radio, la fracción de luz visible abarca solamente desde 380 a 760 nm. Es por otro lado muy notable que todos los procesos fotobiológicos se realicen con luz de una longitud de onda preferentemente limitada a este pequeño intervalo. Hay que destacar además que la mayor parte de la energía radiante emitida por el sol

está comprendida en este estrecho margen de longitudes de onda. La germinación, floración, fructificación y orientación de las plantas hacia la luz, todos los tipos de fotosíntesis y otros procesos como la visión de los animales y el tipo especial de fotofosforilación realizada por el género Halobacterium, son impulsados y regulados por la luz visible.

La luz puede intervenir de dos formas en los diferentes procesos biológicos: suministrando la energía necesaria para que la reacción se lleve a cabo, o actuando de agente modulador, regulando la intensidad con la que el proceso se realiza.

En la fotosíntesis son las luces roja y azul las que suministran el poder energético necesario para desencadenar el proceso, al ser absorbidas por unos pigmentos altamente especializados: clorofilas y carotenos.

Se han descrito últimamente gran cantidad de procesos regulados por la luz roja al interconvertir una sustancia extraordinariamente extendida en el reino vegetal: el fitocromo, que presenta una fracción protéica y un grupo prostético policíclico y que puede estar en su forma activa o en su forma inactiva dependiendo de la longitud de onda de la luz roja que incida sobre él, según el esquema:



El estado, activo o inactivo, del fitocromo, que está modulado por la luz roja regula procesos tan diferentes como germinación, floración, fructificación, movimiento de orgánulos intracelulares, síntesis y transporte de hormonas, control de actividades enzimáticas y cambios en la permeabilidad de las membranas (Briggs y Rice, 1972).

También la luz azul es un agente regulador de muy diferentes respuestas. Warburg et al., (1954) demostraron que para obtener un alto rendimiento en fotosíntesis se necesitaban cantidades catalíticas de luz azul.

Posteriormente se observó el efecto regulador de la luz azul en la apertura y cierre de estomas (Keerberg et al., 1971), la orientación de los cloroplastos en la célula (Haupt, 1970) la fotoquímica de la clorofila (Krasnovskii et al., 1970) y el intercambio de CO_2 y O_2 (Voskresenskaya y Oshmarova, 1969).

Es significativa la similitud que, en ciertos aspectos, ofrecen las respuestas del metabolismo fotosintético del carbono ante el amonio y la luz azul. Ambos agentes estimulan la incorporación del carbono a las proteínas, descendiendo simultáneamente la síntesis de azúcares a partir de dicho elemento. Algunos autores sugieren la posibilidad

de que el efecto de la luz azul esté asociado, al menos parcialmente, con el aumento de la concentración de amoníaco en la célula (Voskresenskaya, 1972).

Existen, por otro lado, gran cantidad de respuestas no relacionadas con la fotosíntesis que son reguladas por la luz azul. La naturaleza del pigmento fotorreceptor ha sido debatida ampliamente entre dos componentes: flavinas y carotenos. Ultimamente se ha demostrado que la mayoría de los procesos regulados por la luz azul incluyen la actuación de las flavinas como pigmentos intermediarios (Muñoz y Butler, 1975).

En este sentido se ha encontrado un estrecho paralelismo entre el espectro de acción de la fotorreducción del citocromo b, en micelios de Neurospora crassa (Muñoz y Butler, 1975) así como en extractos libres de células de Dictyostelium discoideum (Poff y Butler, 1975), y el espectro de absorción de las flavinas. Idéntica similitud se ha encontrado para la fotoinhibición del ritmo circadiano de conidiación de Neurospora (Sargent y Briggs, 1967), la fotoactivación de la síntesis de carotenoides de Neurospora (Zalokar, 1955) y Fusarium (Rau, 1967) y el fototropismo de los coleóptilos de avena y de los esporangióforos de Phicomycetes (Curry y Thiman, 1961).

También se ha demostrado el papel que, como pigmentos receptores de luz azul, desempeñan las flavinas en

la fototaxis y topotaxis de Euglena (Diehn, 1969; Tollim y Robinson, 1969).

Se piensa también que este tipo de regulación se extiende a sistemas animales, ya que los espectros de acción del fotocontrol del ritmo circadiano de Drosophila (Frank y Zimmerman, 1969) y Pectiniphora (Bruce y Minis, 1969) son consistentes con los espectros de acción reseñados antes (Muñoz y Butler, 1975).

Stoy, en 1956, describió la reducción enzimática de nitrato dependiente de luz azul, en un sistema de ensayo anaeróbico con riboflavina exógena. Según el esquema propuesto, la flavina fotoexcitada se reduciría al oxidar al agua y cedería los electrones a la cadena de transporte hasta el nitrato.

También a nivel enzimático, existen diversos trabajos que muestran el papel de la luz azul regulando la actividad de flavoenzimas. Así, en presencia de FMN, la luz azul, pero no la roja, inhibe la actividad de la L-láctico deshidrogenasa, xantino oxidasa y úrico oxidasa (Schmid, 1969). Por otro lado la actividad oxidasa desaminante de glicina de una estirpe incolora de Chlorella se incrementa bajo luz azul y en algunos casos esta misma radiación activa ciertos enzimas implicados en la ruta oxidativa del glicolato, como se ha observado en un mutante amarillo de Chlorella sometido a anaerobiosis (Kowallik, 1969).

Los resultados del presente trabajo muestran que la luz visible, y específicamente la luz azul, reactivan en cortos periodos de tiempo, segundos, la nitrato reductasa de algas verdes y plantas superiores previamente inactiva da tanto in vivo como in vitro. La adición de flavín-nucleó tidos disminuye marcadamente el tiempo requerido para la reactivación.

Asímismo, las evidencias obtenidas permiten sugerir que este proceso de fotorreactivación puede ser de alto sig nificado fisiológico en la regulación de la asimilación del nitrato por estos organismos.

Parte de los resultados que aquí se presentan ha sido objeto de comunicaciones a congresos nacionales e interna cionales (Aparicio et al.*, 1976; Aparicio et al.** , 1976) y de publicaciones en revistas científicas (Aparicio et al. , 1976).

II MATERIALES Y METODOS

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

En este trabajo se han utilizado hojas de Spinacea oleracea y células del alga verde Chlorella fusca.

1.1. Spinacea oleracea

Procedencia del material.- Las hojas de espinaca se recogieron en Gelves (Sevilla). El mismo día de su recolección se lavaron las hojas y, o bien se utilizaron inmediatamente para la obtención del homogenado, o se almacenaron en un congelador a -30°C hasta el momento de su utilización.

Preparación del extracto crudo.- Todos los procesos de purificación se llevaron a cabo a $0-4^{\circ}\text{C}$.

Una vez lavadas las hojas y eliminadas sus nerviaciones se trituraron en una batidora, con tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7,5) conteniendo NO_3K 5 mM, EDTA 1 mM, DTE 0,1 mM y FAD 10 μM . Se añadieron 250 ml de tampón por cada 150 gr de hojas. El homogenado así obtenido se filtró a través de una bolsa de organdí de nylon y se centrifugó a $27.000 \times g$ durante veinte minutos para eliminar los restos celulares.

Purificación de la nitrato reductasa de espinaca. La nitrato reductasa se purificó parcialmente según el método descrito por De la Rosa (1975) realizándose los pasos siguientes:

1º) *Precipitación fraccionada con sulfato amónico.*- Al extracto libre de estructuras celulares se añadió sulfato amónico en polvo hasta un 25% de saturación. Al mismo tiempo, y para evitar los cambios de pH, se añadió la cantidad necesaria de amoniaco diluido. Se mantuvo la preparación durante 15 minutos con agitación ocasional y se centrifugó a 27.000 x g durante 20 minutos. Se desprecipó el precipitado y al sobrenadante se volvió a añadir sulfato amónico hasta alcanzar una concentración del 50%. Después de mantener la preparación 15 minutos con agitación ocasional, se centrifugó a 27.000 x g durante 20 minutos y se resuspendió el precipitado en tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 7,5) conteniendo NO_3K 5 mM, EDTA 1 mM, DTE 0,1 mM y FAD 10 μM . La cantidad de tampón fue aproximadamente 500 ml por cada 4 l de extracto crudo.

2º) *Tratamiento con gel de fosfato cálcico.*- A la fracción anterior se añadió, con agitación constante, una suspensión de gel de fosfato cálcico preparado según se

describe posteriormente, en la proporción de 500 mg de gel por cada 100 ml de extracto. La preparación se mantuvo durante 15 minutos con agitación ocasional y se centrifugó a 3.500 x g durante 5 minutos eliminándose el sobrenadante.

El precipitado se resuspendió en 500 ml de tampón fosfato potásico 0,2 M (pH 7,5) conteniendo NO_3K 5 mM, EDTA 1 mM, DTE 1 mM y FAD 10 μM . El resuspendido se centrifugó durante 20 minutos a 27.000 x g eliminándose el precipitado.

3º) *Concentración con sulfato amónico.*.- Al sobrenadante del paso anterior se añadió sulfato amónico en polvo hasta alcanzar el 50% de saturación. Después de 15 minutos con agitación ocasional se centrifugó la preparación a 27.000 x g durante 20 minutos. El precipitado se resuspendió en 40-50 ml del tampón de fosfato potásico 100 mM conteniendo NO_3K 5 mM, EDTA 1 mM, DTE 0,1 mM y FAD 10 μM , y se dializó contra el mismo tampón durante 12 horas para eliminar el sulfato amónico.

La preparación así obtenida se centrifugó durante una hora a 144.000 x g y el sobrenadante se usó para los experimentos de inactivación.

1. Chlorella fusca

El alga verde unicelular Chlorella fusca Siihira et Krass (= C. pyrenoidosa Chick) 211-215 se obtuvo de la colección Pringsheim de Gottingen.

El medio de cultivo fue esencialmente el descrito por Kessler y Kzygan (1970) y contenía los siguientes compuestos a las concentraciones que se indican:

NO₃ C, 10 mM; ClNa, 8 mM; PO₄HNa₂ · 12 H₂O, 10 mM; PO₄H₂K, 10 mM; SO₄Mg, 1 mM; Cl₂Ca, 0,1 mM; SO₄Fe, 20 μM; Cl₂Mn, 3 μM; BO₃H₃, 8 μM; SO₄Zn, 0,7 μM; MoO₄Na₂, 10 μM y EDTA 34 μM.

Este medio de cultivo se utilizó sin esterilizar, pues al no contener fuente de carbono y emplearse gran masa de células como inóculo, la contaminación era mínima como se comprobó por examen microscópico.

Condiciones de cultivo. - Las células se crecieron a temperatura ambiente en botellas de 20 litros, por las que se hacía pasar mediante borboteo una corriente de aire contenido 5% de CO₂. La iluminación se realizó con tubos fluorescentes de luz blanca.

Para la preparación de los inóculos se partió de células cultivadas en agar o bien de las procedentes de anteriores cultivos en medio líquido.

Estas células se cultivaron en frascos de 4 litros hasta alcanzar una densidad óptica de 4-5 a 660 nm. El cultivo así obtenido se usó como inóculo para las botellas de 20 litros. Después de varios días de crecimiento se recogieron las células al alcanzarse una densidad óptica de 4-5 a 660 nm.

Para separar las células del medio de cultivo se utilizó una centrífuga de flujo continuo, funcionando a temperatura ambiente, que proporcionaba una fuerza centrífuga de 10.000 x g. El sedimento de células se resuspendió en 200-300 ml de agua destilada y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 x g, recogiénose el sedimento de células que contenía entre 150 y 200 g de peso húmedo.

Preparación del extracto libre de células.- Las células recogidas se mezclaron con perlas de vidrio de 0,25-0,30 mm de diámetro, añadiéndose tampón de fosfato potásico 10 mM (pH 7,5) conteniendo NO_3K 5 mM. Por cada 20 gramos de células se añadieron 160 gramos de perlas y 15-17 ml del mencionado tampón. La mezcla se sometió a vibración en el aparato rompedor Buhler, durante 5 minutos a una temperatura de 0-4°C. A con-

tinuación, esta mezcla se lavó con el mismo tampón, filtrando el homogenado a través de cuatro capas de organdí de nylon. Las perlas retenidas en el organdí se lavaron varias veces hasta obtener unos 800-1000 ml de extracto, que se centrifugó a $27.000 \times g$ durante 20 minutos para eliminar los restos celulares.

El extracto crudo así obtenido fue sometido a los siguientes pasos de purificación:

- 1) *Tratamiento con sulfato de estreptomicina.*- Se añadió, lentamente y agitando 1 ml de sulfato de estreptomicina que contenía 73 mg/ml por cada 20 ml de extracto crudo. Se mantuvo durante 15 minutos con agitación ocasional a $0-4^{\circ}\text{C}$ y se centrifugó a $27.000 \times g$ durante 20 minutos eliminándose el precipitado.

- 2) *Precipitación con sulfato de protamina.*- Con objeto de eliminar los ácidos nucleicos, al sobrenadante anterior se añadió, gota a gota y agitando una disolución de sulfato de protamina al 2% (ajustada a pH 7,0 con NaOH 1 N) en proporción de 1 mg de sulfato de protamina por cada 100 mg de proteína total. Después de 15 minutos, durante los cuales la mezcla se agitó ocasionalmente, se centrifugó a $27.000 \times g$ durante 20 minutos y se eliminó el

precipitado.

- 3) *Concentración con sulfato amónico.*- Al sobrenadante anterior se añadió tampón de fosfato potásico 0,5 M (pH 7,5) conteniendo NO_3K 5 mM, EDTA 1 mM, DTE 0,1 mM y FAD 10 μM , hasta alcanzar una concentración final de 0,1 M de fosfato.

A esta preparación se añadió sulfato amónico triturado hasta conseguir el 50% de saturación. El pH se mantuvo constante a 7,5 mediante la adición de amoníaco diluido.

Después de 15 minutos con agitación ocasional se centrifugó la preparación durante 20 minutos a 27.000 x g. El precipitado se resuspendió en el mismo tampón y se dializó durante 12 horas para eliminar el sulfato amónico. Posteriormente la preparación se sometió a 30 minutos de centrifugación a 40.000 x g y se recogió el sobrenadante.

- 4) *Cromatografía en columna de agarosa.*- La disolución anterior se aplicó a una columna de agarosa de 80cm de altura por 5 de diámetro, equilibrada con el tampón de fosfato potásico antes mencionado. Se reunieron las fracciones con actividad nitrato reductasa y se diluyó aproximadamente la preparación hasta que la concentración del tampón de fosfato fué 25 mM, manteniendo las concentraciones de NO_3K ,

EDTA, DTE y FAD.

- 5) *Cromatografía en DE-52.*- La preparación se aplicó a una columna de DE-52 (Whatman), de 12 cm de altura por 2,5 de diámetro, equilibrada con fosfato 25 mM, NO_3K 5 mM, EDTA 1 mM, DTE 0,1 mM y FAD 10 μM . La nitrato reductasa se extrajo por gradiente de fosfato potásico entre 25 y 250 mM, manteniéndose invariables las concentraciones de NO_3K , EDTA, DTE y FAD.

Las fracciones activas se utilizaron para los experimentos de inactivación.

Purificación del enzima inactivado in vivo.- Para la inactivación in vivo de la nitrato reductasa de Chlorella, se cultivaron las células como se describió anteriormente y al final de su fase logarítmica de crecimiento se añadió cloruro amónico a concentración 10 mM. Después de 1,5 horas se recogieron las células por centrifugación y se rompieron en un aparato vibrador Buhler, usando tampón tris ClH (pH 8,2) conteniendo EDTA 1 mM. El extracto libre de células fue tratado con sulfato de estreptomycin y centrifugado a 144.000 x g durante 1 hora. El sobrenadante se concentró bajo atmosfera de N_2 , en un sistema Amicon de ultrafiltración. La preparación así obtenida se usó para los experimentos de reactivación. Una vez que se recogieron

las células, todas las operaciones se realizaron en la oscuridad a 0-4°C.

2. INACTIVACION IN VITRO DE LA NITRATO REDUCTASA

10 ml de la preparación enzimática concentrada, de espinaca o Chlorella, se aplicaron a una columna de Sephadex G-25, de 15 cm de altura por 1,2 de diámetro, equilibrada con Tris ClH 100 mM (pH 8,2) conteniendo FAD 10 μ M.

La preparación así filtrada se incubó durante 45 minutos en la oscuridad y a 0-4°C con NADH 1 mM y CNK 0,3 mM. Con objeto de eliminar el exceso de NADH y cianuro, la preparación se pasó en la oscuridad a través de una columna de Sephadex G-25, de 15 cm de altura por 1,2 de diámetro equilibrada con fosfato potásico 100 mM (pH 6,8). Esta preparación, que contenía la nitrato reductasa inactiva era estable durante algunos días y fue utilizada en los experimentos de reactivación.

3. ILUMINACION DE LA NITRATO REDUCTASA INACTIVADA

La luz fue suministrada por una lámpara halógena de tungsteno marca Sylvania F.C.S. de 150 wátios y 24 voltios.

Las luces de diferentes colores se obtuvieron con filtros Balzers: BT 447 nm para el azul y BT 603 nm para el rojo.

Las intensidades de luz fueron 560, 4,8 y 270 mW/cm^2 para la luz blanca, azul y roja respectivamente.

La preparación enzimática inactiva se iluminó en una cubeta de vidrio de 3 x 1 x 1 cm. que se mantuvo a 0-4°C, por medio de una corriente continua de agua helada.

4. METODOS ANALITICOS

4.1. Determinación de proteínas

Para la determinación de la cantidad de proteínas se siguió el método de Lowry et al. (1951), utilizando ovoalbúmina como proteína patrón.

4.2. Ensayos enzimáticos

La *actividad NADH-nitrato reductasa* se determinó midiendo espectrofotométricamente la velocidad de oxidación de NADH en la mezcla de reacción, la cual contenía, en un volumen final de 2,5 ml, fosfato potásico 100 mM (pH 7,5), nitrato potásico 5 mM, NADH 0,1 mM y la cantidad adecuada de la preparación enzimática (Hageman y Hucklesby, 1971).

La *actividad NADH-diaforasa* se determinó midiendo espectrofotométricamente la velocidad de reducción del citocromo c. La mezcla de reacción contenía en un volumen total de 2,5 ml, fosfato potásico 100 mM (pH 7,5), citocromo c 0,5 mM, NADH 0,1 mM y la cantidad adecuada de la preparación enzimática (Aparicio et al., 1969).

La *actividad FNH₂-nitrato reductasa* se valoró midiendo la cantidad de nitrito formado en una mezcla de reacción

que contenía, en un volumen final de 1 ml Tris-ClH 100 mM (pH 7,5) , NO_3K 10 mM, FMN 0,2 mM reducido químicamente con $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ (8 mg de $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ en 1 ml de CO_3HNa de 8 mg/ml) y la cantidad adecuada de la preparación enzimática. Después de incubar a 30°C durante 5 min se detuvo la reacción mediante agitación en un ciclomixer hasta la aparición del color amarillo del FMN oxidado (Paneque et al., 1965).

A continuación, se añadió a la mezcla 1 ml de reactivo de sulfanilamida y 1 ml de N-naftil-etilendiamina. Se completó con agua hasta 5 ml y se dejó desarrollar el color durante 10 minutos antes de medir espectrofotométricamente la absorbancia a 540 nm (Snell y Snell, 1949).

4.3. Determinaciones espectrofotométricas

La oxidación del NADH se midió a 340 nm y la reducción del citocromo c a 550 nm.

Los coeficientes de extinción molar usados fueron $6,2 \times 10^3$ para el NADH y 27×10^3 para la reducción del citocromo c.

Para la determinación de la cantidad de nitrito formado se construyó una recta de calibrado con concentraciones conocidas de nitrito.

5. REACTIVOS Y APARATOS

5.1. Preparación del gel de fosfato cálcico

El gel de fosfato cálcico se preparó según el método descrito por Wood (1955). Se añadieron 150 ml de una disolución de cloruro cálcico (88,6 g de $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, por litro) a 160 ml de agua destilada. A continuación se añadieron agitando 150 ml de fosfato trisódico (152 g de $\text{PO}_4\text{Na}_3\cdot 12\text{H}_2\text{O}$, por litro) y se ajustó el pH a 7,4 con ácido acético 1 M. El precipitado se lavó 5 veces en agua destilada, se centrifugó y se resuspendió en la cantidad de agua destilada necesaria para dar lugar a una concentración de 10 mg/ml. Para comprobar la concentración de fosfato cálcico en esta suspensión se tomó una alícuota y se desecó en una estufa a 100°C , pesando después el residuo sólido.

5.2. Procedencia de los productos químicos

El NAD^+ , NADH, NADP^+ , NADPH, AMP, ADP, ATP, FMN, FAD, sulfato de protamina, y EDTA se obtuvieron de SIGMA, St. Louis USA; DTE y citocromo c de SERVA, Heidelberg, Alemania; cianuro, ferricianuro y fosfato potásico, así como el cloruro amónico de MERCK, Darmstadt, Alemania; el Sephadex de FARMACIA, Upsala, Suecia; las perlas de vidrio, de B. BRAUN, Melsungen, Apparatebau, Alemania, y el sulfato

de estreptomicina de la COMPAÑIA ESPAÑOLA DE PENICILINA. Todos los demás productos utilizados eran de grado analítico.

El agua destilada para preparar las soluciones y lavar el material de laboratorio fue desionizada en un desionizador SETA tipo R-100 serie 2/67 y destilada en un destilador de vidrio AFORA.

El N_2 fue suministrato por COROMINA INDUSTRIAL.

5.3. Aparatos

Las medidas de nitrito se realizaron en un espectrofotómetro BAUSCH & LOMB modelo Spectronic 700.

Para las demás determinaciones espectrofotométricas se utilizaron los aparatos BECKMAN DK-2A y PYE UNICAM SP 1.800.

Las cromatografías se realizaron con columnas fabricadas por FARMACIA, Upsala, Suecia, con dispositivo adaptador de flujo.

El colector automático de fracciones utilizado fué un LKB modelo Ultrorac 7.000.

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

El pH se midió en un aparato METROHM HERISAU modelo E 512.

III RESULTADOS

1. CARACTERIZACION DEL CITOCROMO b_{558} EN LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA

La nitrato reductasa ha sido descrita como un complejo enzimático que posee FAD y molibdeno como transportadores de electrones. Pero, especialmente en el caso del enzima de espinaca, no existía aún evidencia concluyente acerca del contenido en hierro de la proteína. Nuestros resultados actuales demuestran que la nitrato reductasa contiene citocromo b_{558} . El espectro diferencial de una preparación, purificada según se describe en Materiales y Métodos, incubada con NADH o hidrosulfito presentó unos picos de absorción a 558, 537 y 426 nm, con un hombro a 515 nm, que son característicos de la forma reducida del citocromo tipo b (Fig. 1).

El hecho de que el espectro diferencial de la preparación incubada con ascorbato no mostrase ningún cambio de absorbancia significativo, indica que este citocromo b_{558} posee un potencial relativamente bajo, más cercano al de los piri - dín nucleótidos que al del nitrato.

1.1. Participación del citocromo b_{558} en la transferencia de electrones desde el NADH al nitrato

La adición de nitrato a una preparación enzimática

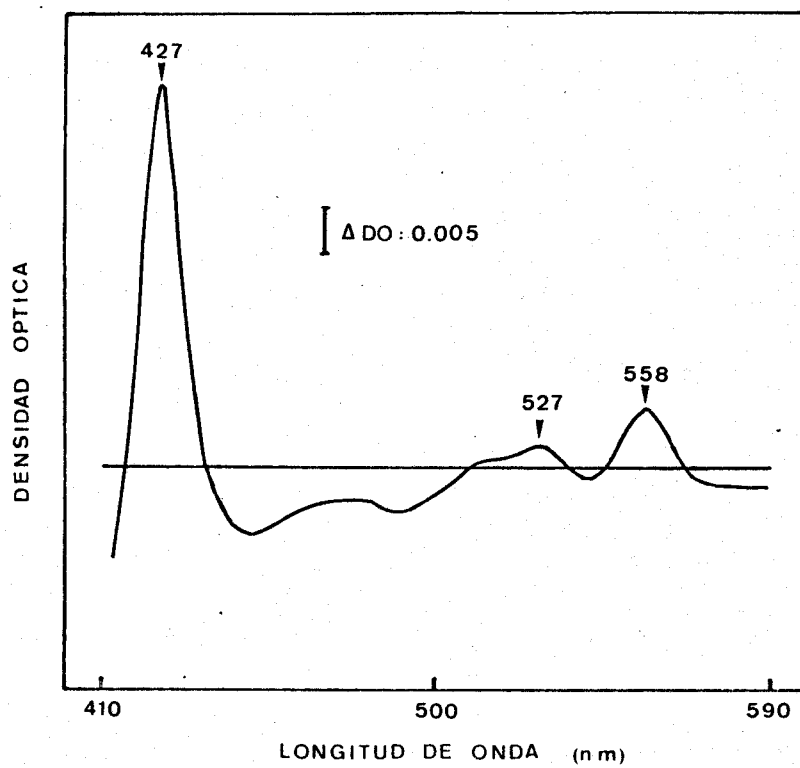


Figura 1.- ESPECTRO DIFERENCIAL DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA REDUCIDA CON NADH, VERSUS NO ADICION

incubada previamente con NADH, que presentaba los picos característicos del citocromo b₅₅₈ en su estado reducido, dió lugar a la oxidación del citocromo en un corto periodo de tiempo (5 min).

El tiempo necesitado para reoxidar totalmente el enzima por nitrato aumentaba significativamente si, previamente a la adición de nitrato, la preparación se incubaba con cianuro además de con NADH.

Estos resultados prueban que el citocromo b₅₅₈ presente en la nitrato reductasa forma parte de su cadena de transporte electrónico, puesto que el estado de oxido-reducción de este componente depende de la presencia de donadores y aceptores de electrones y de los inhibidores específicos de este enzima.

2. EFECTO DE LA LUZ VISIBLE SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA

La presencia de FAD y citocromo b_{558} en la nitrato reductasa y su similitud con otras proteínas fotosensibles, que contienen el mismo tipo de grupos prostéticos, justificaron el estudio de las propiedades fotoquímicas de este complejo enzimático.

La nitrato reductasa es un enzima interconvertible cuya forma inactiva se produce como consecuencia de una sobrerreducción de la proteína. Sin embargo, la reactivación fisiológica probablemente debida a una reoxidación del enzima, no había sido objeto de la atención debida, hecho que motivó el estudio del papel de la luz visible como uno de los factores que pudiesen intervenir en este proceso, fotooxidando algunos de los componentes de la nitrato reductasa.

La Fig. 2 muestra la cinética de reactivación por luz blanca de una preparación purificada de nitrato reductasa, previamente inactivada por NADH y cianuro. La reactivación total del enzima (ver también Tabla I) se alcanzó a los pocos minutos de iluminación con luz blanca, con intensidad de 560 mW/cm^2 .

La luz roja, de longitud de onda superior a 604 nm y de una intensidad de 270 mW/cm^2 no ejerció ningún efecto sobre la actividad del enzima. Este mismo resultado se obtuvo al mantener en oscuridad el enzima inactivado.

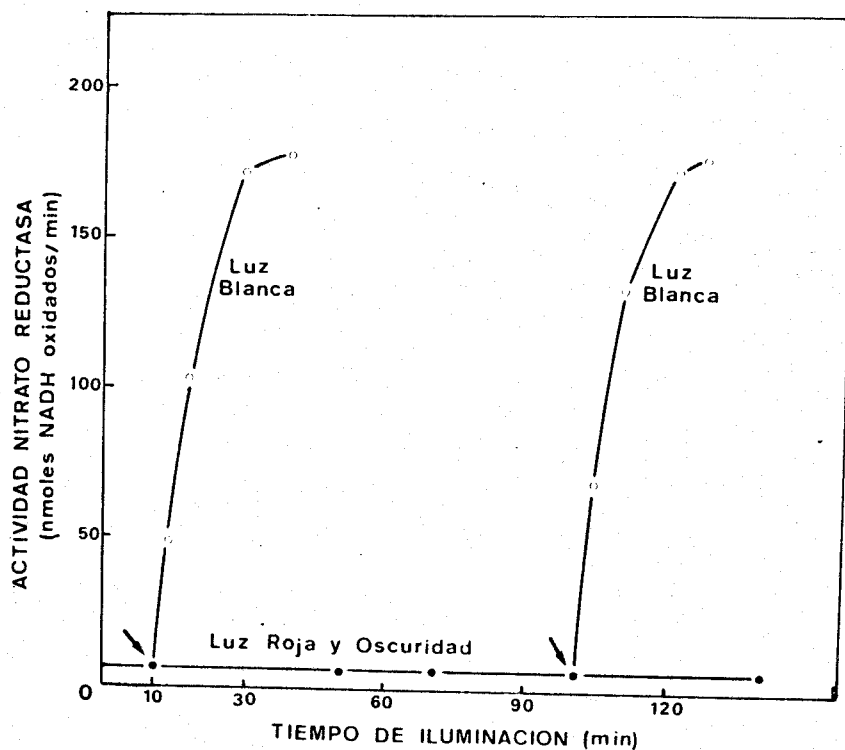


Figura 2.- REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPI-
NACA POR LUZ BLANCA.

A los tiempos indicados se extrajeron alícuotas de 1 mg de proteína y se ensayaron espectrofotométricamente siguiendo la desaparición de NADH a 340 nm, según se describe en Materiales y Métodos. Cuando se incubaron muestras similares de la preparación inactiva en presencia de ferricianuro, la actividad alcanzada fue de 140 nmoles de NADH oxidados por minuto.

Sin embargo, la luz azul de 450 nm demostró ser efectiva en la fotoconversión de la nitrato reductasa (Fig. 3), aunque el tiempo necesario para conseguir la reactivación total fue mayor que en el caso de la luz blanca, probablemente debido a su baja intensidad ($4,8 \text{ mW/cm}^2$).

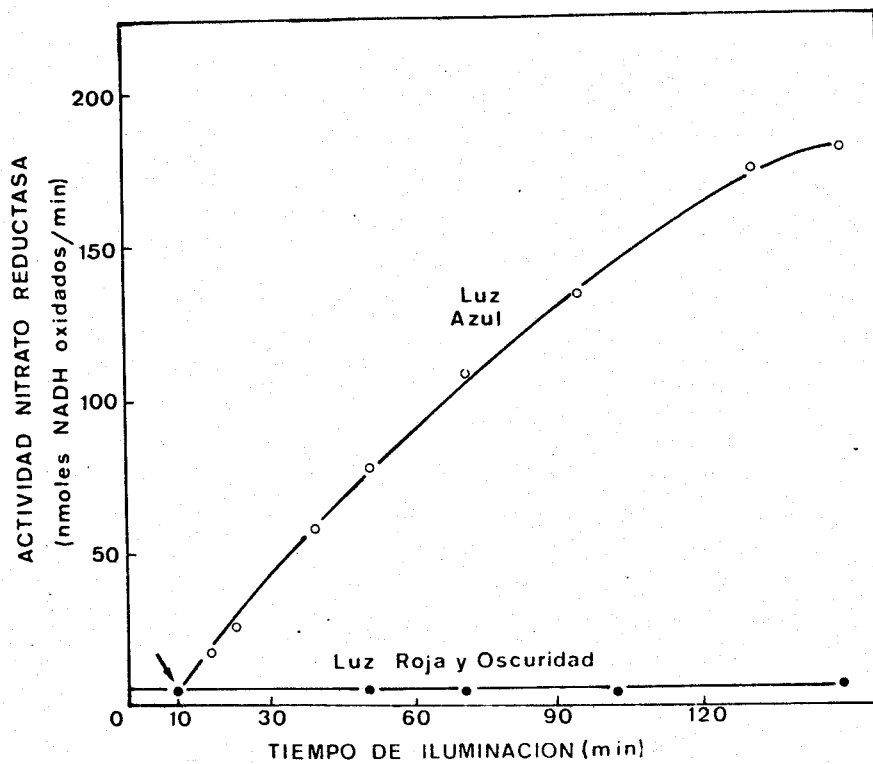


Figura 3.- REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ AZUL.

Condiciones experimentales como en la Figura 2.

3. EFECTO DE LOS FLAVIN-NUCLEOTIDOS EN LA FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA

La adición de FAD o FMN a la preparación inactivada disminuyó considerablemente el tiempo de iluminación necesario para conseguir la fotoconversión de la nitrato reductasa inactiva en su forma activa.

La Fig. 4 muestra la cinética de reactivación por luz blanca en presencia de estos nucleótidos. La reactivación se alcanzaba rápidamente en presencia de FMN, pero en este caso se apreciaba una caída en la actividad al continuar iluminando el enzima una vez que este había alcanzado su máxima reactivación.

Es de destacar que ni el FAD ni el FMN ejercieron efecto reactivante alguno cuando el enzima se iluminó con luz roja, o se mantuvo en oscuridad, en presencia de estos nucleótidos.

Los resultados que se presentan en la Fig. 5, muestran que el comportamiento cinético del enzima iluminado en presencia de FAD, con luces de diferentes longitudes de onda, es idéntico al del enzima iluminado en ausencia de la flavina. La luz blanca y específicamente la luz azul, tienen un claro efecto reactivante mientras que la luz roja resultó ser inefectiva (Ver Figs. 3 y 4).

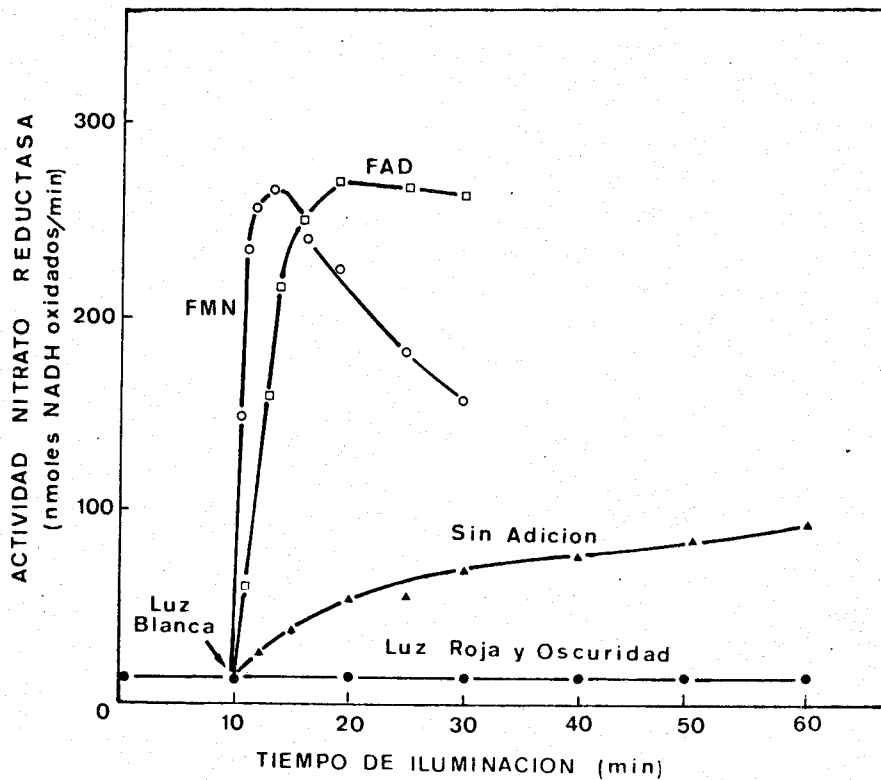


Figura 4.- EFECTO DE LOS FLAVIN-NUCLEOTIDOS EN LA FOTO-REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPI-NACA.

Para las medidas de actividad se utilizaron alícuotas de 1,2 mg de proteína. La preparación inactiva se iluminó en presencia de FAD o FMN 20 μ M. La actividad enzimática de esta preparación fue significativamente menor, al iluminar en ausencia de flavina, que la alcanzada en el caso de la Figura 2; el enzima se preparó con una nueva columna de Sephadex y aparentemente perdió parte de la flavina endógena.

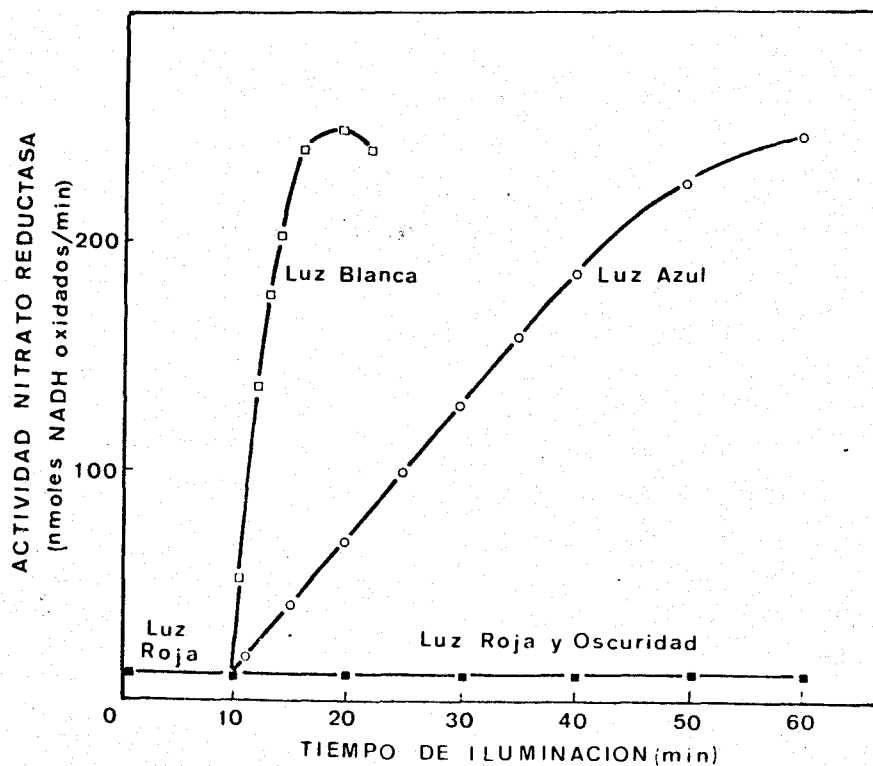


Figura 5.- REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUCES DE DIFERENTES LONGITUD DE ONDA, EN PRESENCIA DE FAD.

Condiciones experimentales como en la Figura 4. La concentración de FAD fue 20 μ M.

En orden a la cuantificación del proceso fotorreactivante, era interesante comprobar si el enzima reactivado por la luz llegaba a alcanzar los mismos niveles de actividad que los presentados antes de su inactivación. La Tabla I pone de manifiesto cómo la luz actínica es capaz de producir la reactivación total del enzima, siendo comparables las actividades específicas del enzima nativo, del fotorreactivado y del reactivado químicamente por ferricianuro.

La Fig. 6 muestra la reactivación conseguida al iluminar la nitrato reductasa en presencia de diferentes concentraciones de FAD manteniendo constantes el tiempo de iluminación y la intensidad de luz. La reactivación total del enzima se alcanzó, en estas condiciones, cuando se añadió una concentración de FAD 10 μ M. Al modificar la cantidad total de energía luminosa que incidía sobre la preparación, esto es: el producto de la intensidad de luz por el tiempo de iluminación, se modificaba a su vez, de forma inversa, la concentración de flavina requerida para obtener el mismo efecto reactivante. Estos resultados sugieren que los flavín nucleótidos actúan en este proceso de fotoconversión como pigmentos colectores de luz.

TABLA I

REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ
BLANCA EN PRESENCIA DE FAD

Preparación	Tratamiento	Actividad especif. mU/mg prot.
Enzima nativo	-	173
Enzima inactivado	-	6,5
"	Fe (CN) ₆ ³⁻ *	153
"	Luz blanca + FAD	167

* La preparación inactiva se preincubó en presencia de 0,3 mM de ferricianuro potásico durante 2 min a temperatura ambiente. La iluminación del enzima se realizó durante 5 min a 0-4°C en presencia de FAD 20 μM. Nitrato reductasa, 0,8 mg. Se define como unidad de enzima la cantidad de nitrato reductasa que oxida 1 μmol de NADH por minuto.

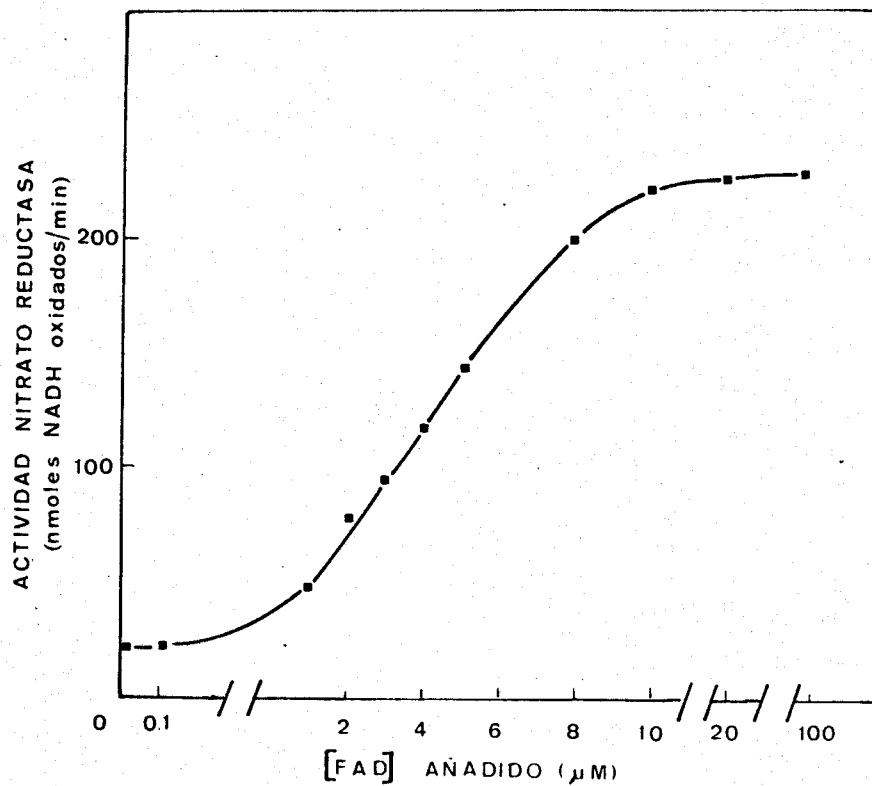


Figura 6.- EFECTO DE LA CONCENTRACION DE FAD SOBRE LA REACTIVACION POR LUZ BLANCA DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA.

Las diferentes preparaciones fueron iluminadas durante 5 min a 0-4°C. Nitrate reductase, 0,6 mg.

4. ESTUDIO DEL PROCESO DE REACTIVACION AL SOMETER LA NITRATO REDUCTASA A ILUMINACION INTERMITENTE

Es de destacar el caracter irreversible de la fotorreactivación de la nitrato reductasa. Como se observa en la Fig. 7, una vez que la fotorreactivación, total o parcial, había tenido lugar, no se producían cambios en la actividad enzimática cuando la preparación se mantenía en la oscuridad.

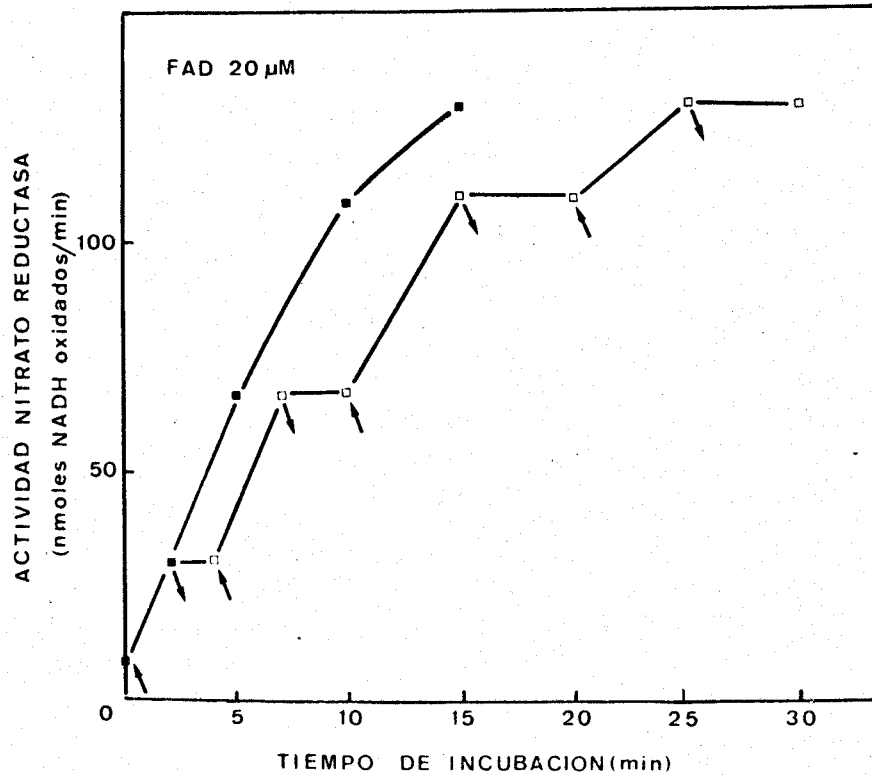


Figura 7.- FOTOCONVERSION DE LA NITRATO REDUCTASA INACTIVA EN ACTIVA CON ILUMINACION INTERMITENTE.

La preparación inactivada se iluminó con luz blanca en presencia de FAD 20 μ M. Flechas hacia arriba; encender la luz. Flechas hacia abajo; apagar la luz. Nitrato reductasa, 0,6 mg.

5. FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA EN PRESENCIA DE NITRATO

El estudio del posible efecto del nitrato, aceptor fisiológico de electrones y por tanto agente oxidante de la nitrato reductasa, presentaba a priori un especial interés por ser la oxidación del enzima el proceso responsable de su activación dentro del fenómeno de interconversión. Además, estaba establecido que el nitrato protegía al enzima de la inactivación por los piridín nucleótidos reducidos, tanto en ausencia como en presencia de cianuro, si bien no era capaz de revertir la inactivación una vez que ésta había tenido lugar.

Los resultados que se presentan en la Figura 8 muestran que la cinética de fotorreactivación de la nitrato reductasa de espinaca no experimentaba ninguna variación al iluminar con o sin FAD exógeno-la preparación inactivada, en presencia y ausencia de nitrato.

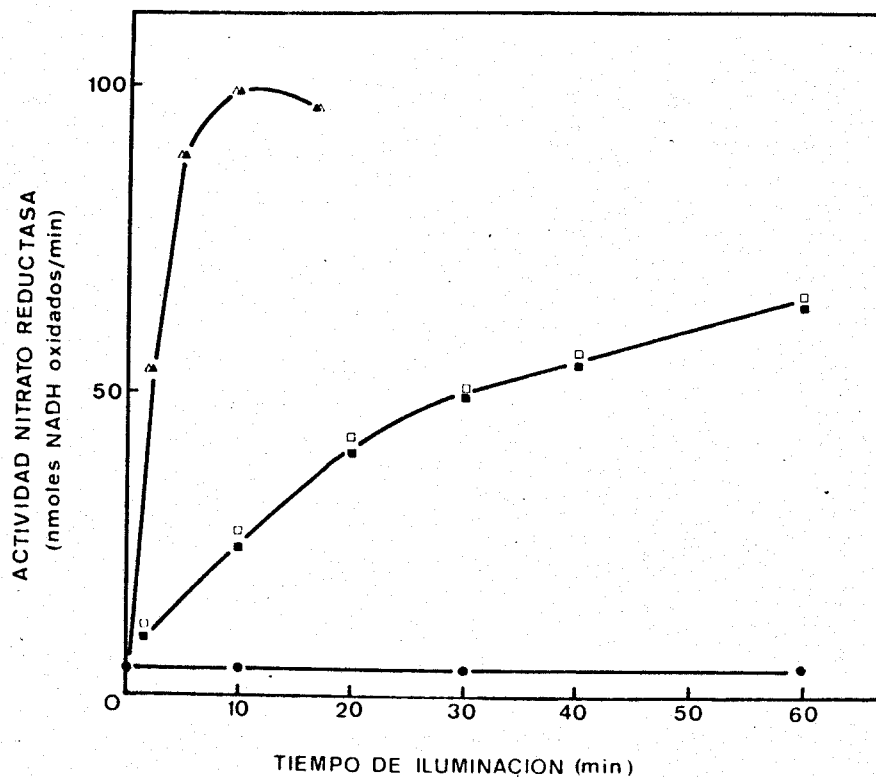


Figura 8.- REACTIVACION POR LUZ BLANCA DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA EN PRESENCIA DE NO_3K .

La preparación inactivada se iluminó en presencia de FAD 20 μ M (Δ), FAD 20 μ M + NO_3K 10 mM (\blacktriangle), NO_3K 10 mM (\square) y sin adición (\blacksquare). Control en oscuridad, \pm NO_3K : (\bullet). Nitrito reductasa, 1,5 mg.

6. EFECTO DEL pH EN LA FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA

La Fig. 9 muestra como la fotorreactivación del enzima se produjo dentro de un amplio margen de unidades de pH, que abarcaban desde 5 a 10.

Cabe sin embargo destacar que dentro de un intervalo de pH más próximo al fisiológico, la reactivación tuvo lugar con mayor efectividad a pHs 6 y 7, mientras que a pHs 8 y 9, la reactivación fué significativamente menor.

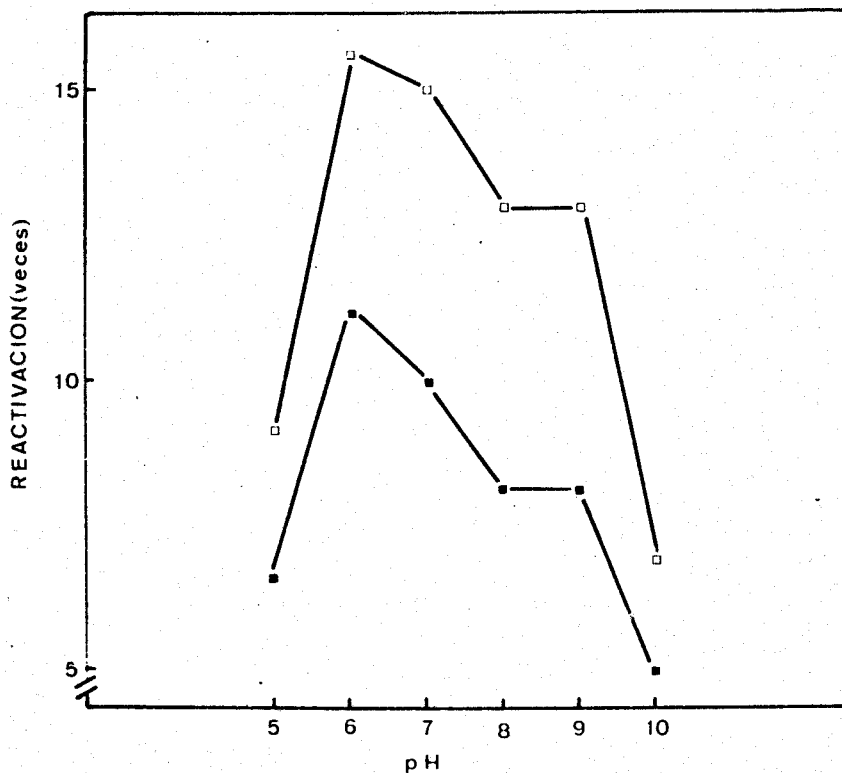


Figura 9.- EFECTO DEL pH SOBRE LA FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA, EN PRESENCIA DE FAD.

El enzima inactivado con NADH y CNK se dializó por una columna de Sephadex G-25 equilibrada con fosfato potásico 10 mM (pH 6,8). Las diferentes preparaciones se iluminaron con luz blanca durante 3 min (■) o 6 min (□) a 0-4°C, en presencia de FAD 20 μM. Los pHs indicados se obtuvieron añadiendo en cada caso los tampones que se especifican hasta una concentración 100 mM; citrato-fosfato para pH 5,0; fosfato potásico para pHs 6,0 y 7,0; Tris-ClH para pH 8,0 y glicina-KOH para pHs 9,0 y 10,0. La reactivación se define como número de veces que se incrementa la actividad frente al control sin iluminar. Nitrato reductasa, 0,6 mg.

7. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA

La fotorreactivación de la nitrato reductasa era dependiente de la temperatura, tanto en presencia como en ausencia de FAD exógeno. En todos los casos, la velocidad de reactivación fue mayor al aumentar la temperatura de la preparación enzimática durante su iluminación.

La Tabla II muestra que, en ausencia de FAD exógeno, la actividad del enzima iluminado durante 10 minutos a 30°C fue doble que la alcanzada cuando la iluminación se llevó a cabo a 0°C.

La fotorreactivación del enzima en presencia de FAD 20 μ M, cuya cinética a diferentes temperaturas se presenta en la Figura 10, aumentaba al iluminar el enzima a temperaturas crecientes. Para cualquiera de las temperaturas estudiadas, el enzima alcanzaba su reactivación total si se prolongaba adecuadamente el tiempo de iluminación.

TABLA II

REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ
BLANCA A DIFERENTES TEMPERATURAS

Tratamiento	Actividad nitrato reductasa (nmoles NADH oxid./5 min)
Oscuridad	15,75
Iluminación a 0°C	52,5
" a 10°C	63,0
" a 20°C	73,5
" a 30°C	100,25

Las medidas de actividad se realizaron en alícuotas extraídas después de 10 min de iluminación a las temperaturas que se indican. Nitrato reductasa 0,5 mg.

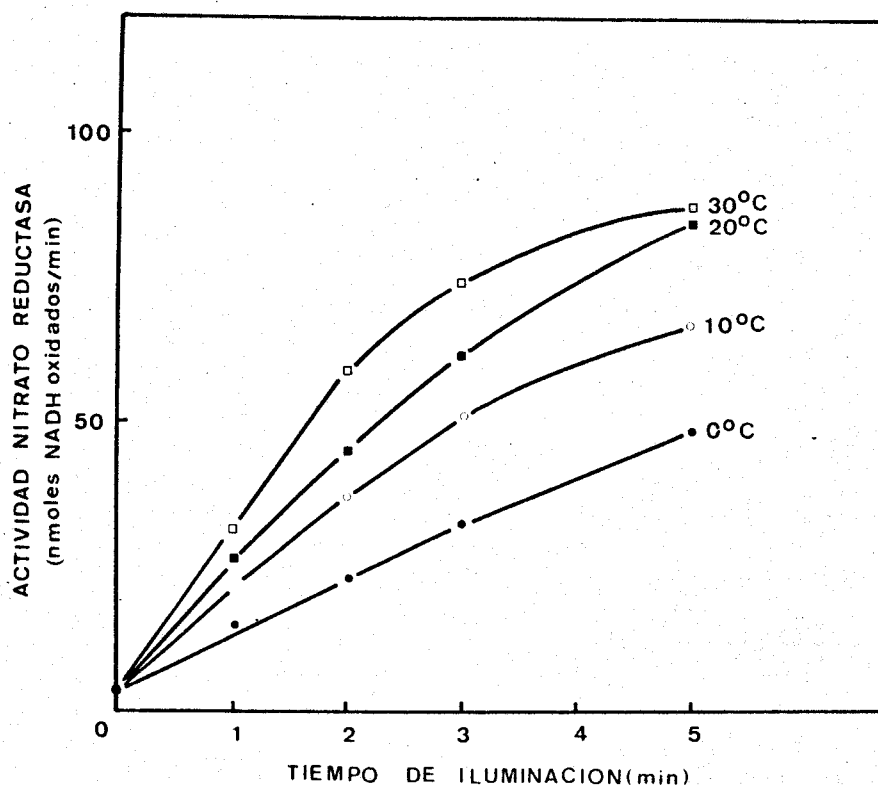


Figura 10.- EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ BLANCA, EN PRESENCIA DE FAD.

La preparación inactivada se iluminó a las temperaturas que se indican en presencia de FAD 20 μ M. Nitrato reductasa, 0,9 mg.

8. EFECTO DE LOS PIRIDIN-NUCLEOTIDOS OXIDADOS Y DE LOS ADENIN-NUCLEOTIDOS EN LA FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA

Cuando se iluminó con luz blanca una preparación inactiva, en presencia de estos compuestos, se observó un ligero efecto potenciador de la fotorreactivación, especialmente en el caso del AMP y ADP (Tabla III). Esta potenciación fué siempre inferior a la conseguida al iluminar en presencia de los flavín nucleótidos.

Sin embargo, cuando se utilizó luz azul para iluminar el enzima, la presencia de los piridín-nucleótidos oxidados y los adenín-nucleótidos no estimuló en absoluto el proceso de fotorreactivación, tanto en presencia como en ausencia de FAD (Tablas IV y V).

TABLA III

EFFECTO DE DIVERSOS NUCLEOTIDOS EN LA REACTIVACION DE LA
NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ BLANCA

Adición	Actividad nitrato reductasa (nmoles NADH oxid./min)
Ninguna	14,7
NAD ⁺ 1 mM	25,7
NADP ⁺ "	30,3
ATP "	28,0
ADP "	42,0
AMP "	42,0
FAD 20 μM	168,0

La preparación inactivada se iluminó, en presencia de los nucleótidos que se indican, durante 10 min a 0-4°C. Nitrato reductasa, 1,0 mg. La actividad de nitrato reductasa mostrada por la preparación antes de iluminar, en las mismas condiciones de ensayo, era de 5 nmoles de NADH oxidado por minuto.

TABLA IV

REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR LUZ AZUL EN
PRESENCIA DE DIFERENTES NUCLEOTIDOS

Adición	Actividad nitrato reductasa (nmoles NADH oxid./min)
Ninguna	23,1
NAD ⁺ 1 mM	23,3
NADP ⁺ "	23,3
ATP "	21,0
ADP "	21,0
AMP "	25,0
FAD 20 μM	144,4

La preparación inactivada se iluminó durante 15 min a 0-4°C. Nitrato reductasa, 1,0 mg. Se utilizó la misma preparación inactiva que en la Tabla III.

TABLA V

EFFECTO DE DIFERENTES NUCLEOTIDOS SOBRE LA REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR LUZ AZUL EN PRESENCIA DE FAD

Adición	Actividad nitrato reductasa (nmoles NADH oxid./min)
FAD 20 μ M	143,8
" + NAD ⁺ 1 mM	131,2
" + NADP ⁺ "	136,0
" + ATP "	136,0
" + ADP "	147,0
" + AMP "	144,3

Tiempo de iluminación, 15 min. Nitrato reductasa, 1,0 mg.
Se utilizó la misma preparación inactiva que en la Tabla III.

9. EFECTO DE LOS PIRIDIN-NUCLEOTIDOS REDUCIDOS EN LA FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA

Estaba establecido que los piridín-nucleótidos reducidos actuaban como efectivos agentes inactivantes de la nitrato reductasa al provocar la reducción del enzima y se les había atribuido un papel fisiológico en la regulación de la asimilación del nitrato. Por tanto, era del máximo interés el estudio de su interacción en el proceso de fotorreactivación.

Los resultados que se muestran en la Tabla VI indican que una preparación enzimática inactiva, conteniendo FAD 20 μM , no se reactivó significativamente al ser iluminada, en este experimento durante 10 min, en presencia de NADH.

El NADPH, que en nuestro caso es incapaz de actuar como donador de electrones para la reducción enzimática del nitrato, tubo un efecto similar al de NADH impidiendo la fotorreactivación de la nitrato reductasa en el tiempo de iluminación, 15 min, utilizado en este experimento (Tabla VII).

Sin embargo, la fotorreactivación tuvo lugar cuando se iluminó la preparación inactiva, en presencia de NADH durante periodos mayores de tiempo. La cinética del proceso de fotorreactivación, que en ausencia de NADH era de naturaleza hiperbólica, mostró en este caso caracter sigmoide. Por otro lado, el periodo inicial de inhibición de la fotorreactivación se incrementó al aumentar la concentración del nucleótido reduci-

TABLA VI

EFFECTO DEL NADH SOBRE LA REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ BLANCA EN PRESENCIA DE FAD

Adición de reductor	Iluminación (min)	Actividad nitrato raso (nmoles NADH oxid./min)
Ninguna	0	4,85
Ninguna	10	66,5
NADH	0	4,85
NADH	10	14,0

La preparación inactiva se iluminó en todos los casos en presencia de FAD 20 μ M y donde se indica, de NADH 0,6 mM. La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente como se describe en Materiales y Métodos. Nitrato reductasa, 0,8 mg.

TABLA VII

EFFECTO DEL NADPH SOBRE LA REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ BLANCA EN PRESENCIA DE FAD

Adición de reductor	Iluminación (min)	Actividad nitrato raso (nmoles NADH oxid./min)
Ninguna	0	6,86
Ninguna	15	83,25
NADPH	0	6.60
NADPH	15	12,12

La preparación inactiva se iluminó en todos los casos en presencia de FAD 20 μ M y donde se indica, de NADPH 0,6 mM. Nitrato reductasa, 1,2 mg.

do. Pero una vez comenzada la reactivación, la pendiente de la sigmoide fue la misma en todos los casos y no se modificó al aumentar la concentración de NADH (Fig. 11).

La Figura 12 muestra los resultados de un experimento similar al anterior pero utilizando NADPH en lugar de NADH. En este caso también se modificó la cinética de fotorreactivación, que pasó de hiperbólica a sigmoide, al iluminar el enzima en presencia de este nucleótido. Se puede por tanto afirmar que el NADH y el NADPH ejercen efectos similares en la fotorreactivación de la nitrato reductasa.

Los resultados que se presentan en la Fig. 13 muestran que la concentración de piridín-nucleótido reducido presente en las preparaciones, que contenían FAD, disminuía marcadamente a lo largo del transcurso del tiempo de iluminación. Estaba descrito que por la acción de la luz las flavinas eran capaces de oxidar estos nucleótidos en un proceso exclusivamente fotoquímico (Vernon, 1959).

El comienzo de la reactivación del enzima coincidía precisamente con el momento en que prácticamente todo el NADH había sido fotooxidado.

El nitrato que, como se mostró anteriormente, no ejercía ningún efecto sobre la cinética de la fotorreactivación, tanto en presencia como en ausencia de FAD, tenía un marcado efecto alterando la sigmoide de fotorreactivación cuando el

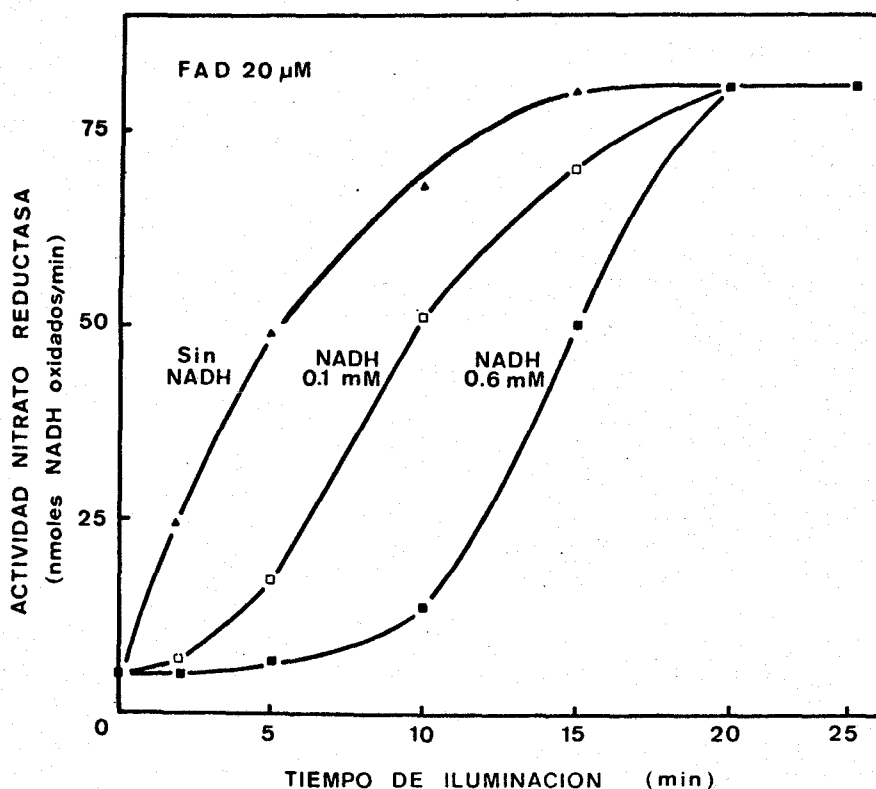


Figura 11.- CINETICA DE REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ BLANCA, EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NADH.

La preparación inactiva se iluminó en presencia de FAD 20 μ M y de NADH a las concentraciones que se indican. Nitrito reductasa, 0,8 mg.

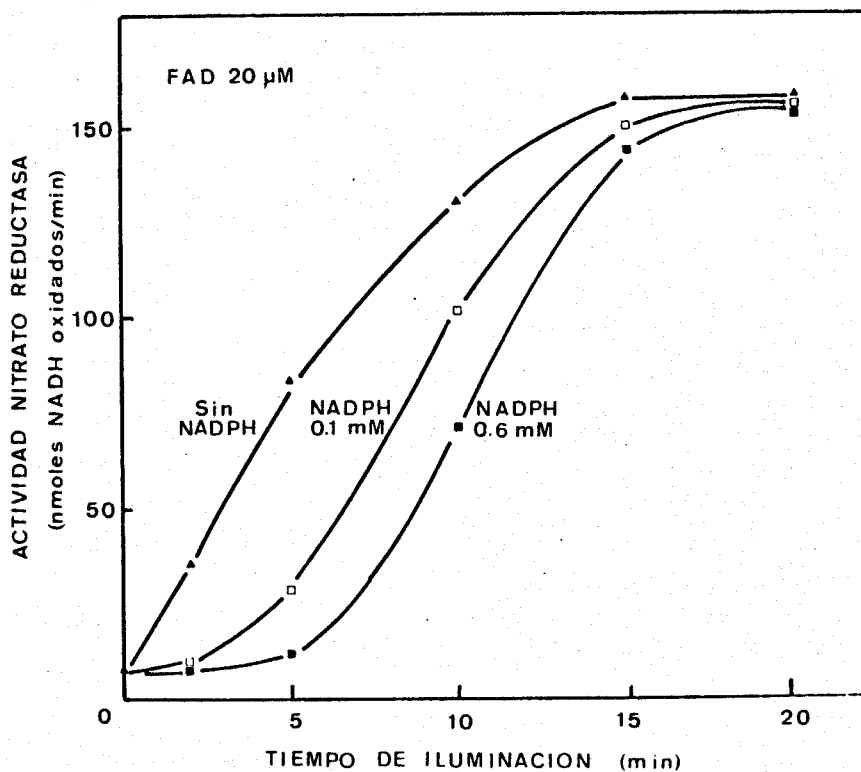


Figura 12.- EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NADPH EN LA CINETICA DE REACTIVACION POR LUZ BLANCA DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA.

El enzima inactivo se iluminó en todos los casos en presencia de FAD 20 μ M y de las concentraciones de NADPH que se indican. Nitrato reductasa, 1,2 mg.

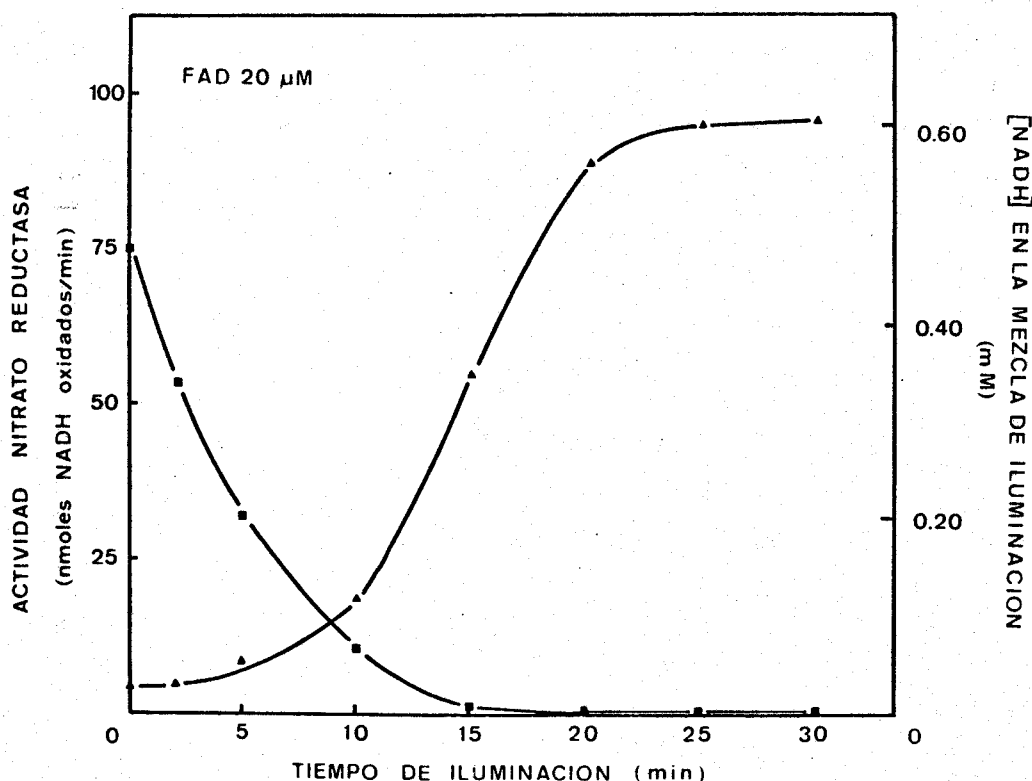


Figura 13.- RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE NADH PRESENTE EN LA MEZCLA DE ILUMINACION Y LA FOTO-RREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA.

El enzima inactivo se iluminó con luz blanca en presencia de FAD 20 μ M y NADH 0,6 mM. La concentración de NADH a lo largo del tiempo (■) se determinó espectrofotométricamente a 340 nm en alícuotas de la mezcla de iluminación, previamente al ensayo de actividad (▲). Nitrato reductasa, 1,1 mg.

enzima se iluminaba en presencia de NADH. La Figura 14 muestra que el período de latencia de la sigmoide de reactivación del enzima en presencia de NADH, donador fisiológico de electrones de la nitrato reductasa, se hacía menor al estar el nitrato también presente en la mezcla de iluminación. Asimismo se hacía más pronunciada la pendiente de la sigmoide.

Los resultados que se presentan en la Figura 15 muestran que cuando se iluminaba el enzima en presencia de NADPH, la sigmoide de reactivación se alteraba en mucho menor grado por la presencia de nitrato que cuando la iluminación se realizaba en presencia de NADH (Fig. 14).

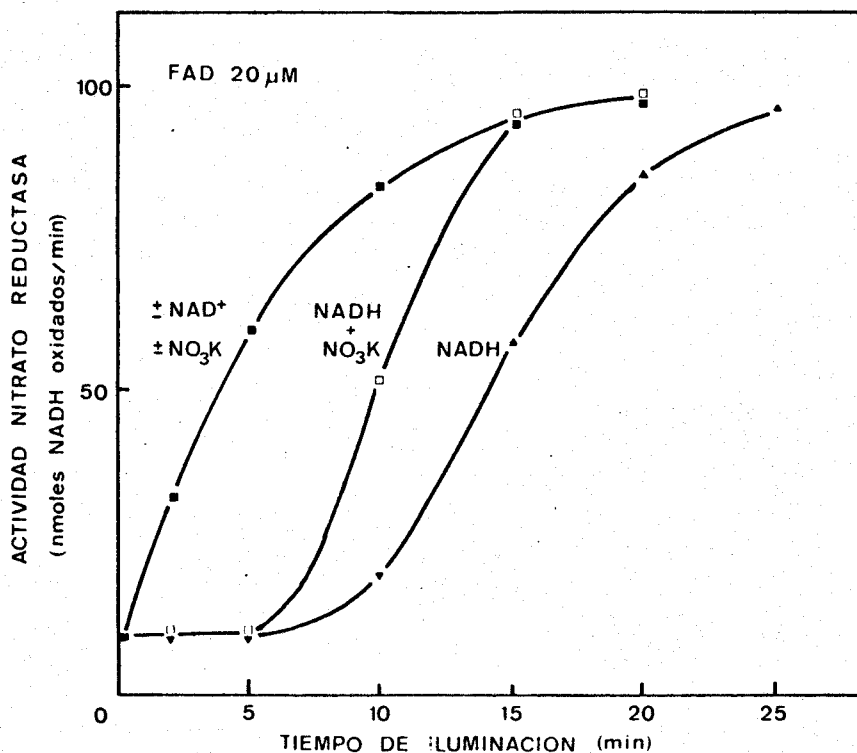


Figura 14.- REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA POR LUZ BLANCA EN PRESENCIA DE NADH Y NO₃K.

El enzima inactivo se iluminó en todos los casos en presencia de FAD 20 μM y donde se indica, de NO₃K 5 mM y/o NAD(H) 0,6 mM. Nitrato reductasa, 1,0 mg.

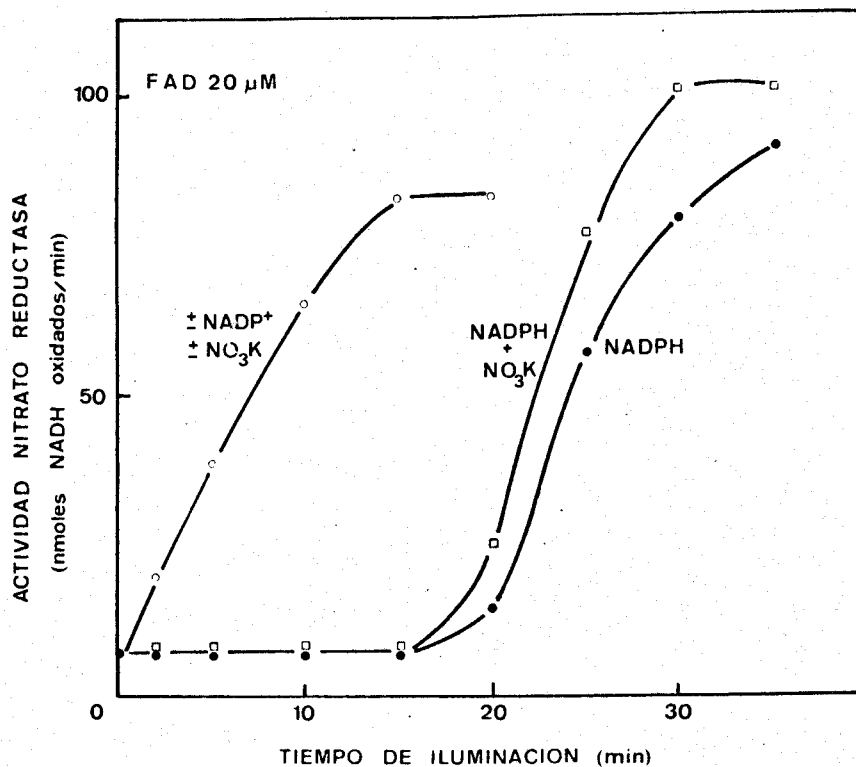


Figura 15.- REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPI-
NACA POR LUZ BLANCA EN PRESENCIA DE NADPH Y
NO₃K.

El enzima inactivo se iluminó en todos los casos en presencia de FAD 20 μ M y donde se indica, de NO₃K 5 mM y/o NADP(H) 1 mM. Nitrato reductasa, 0,9 mg.

10. EFECTO DEL EDTA EN LA FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA

El papel del EDTA en los procesos fotoquímicos en que participan los flavín-nucleótidos está ampliamente estudiado. Los flavín-nucleótidos, al ser excitados por la luz, oxidan este compuesto. En anaerobiosis se observa la desaparición de los picos característicos del espectro de las flavinas oxidadas, debido a su fotorreducción total por el EDTA. En aerobiosis, bajo la acción de la luz actínica, el EDTA reduce a los flavín-nucleótidos que a su vez son reoxidados por el oxígeno molecular y por tanto permanecen en su estado oxidado (Mc Cormick, 1968). Para una determinada intensidad de luz, la concentración de flavín-nucleótidos en estado excitado depende de las concentraciones de EDTA y O_2 , por lo que puede llegar a ser poco probable, en presencia de estas sustancias, la transferencia de energía de los flavín-nucleótidos al FAD que forma parte del enzima.

La fotorreactivación del enzima se veía claramente afectada por cantidades crecientes de EDTA en la mezcla de iluminación (Fig. 16). De esta forma el EDTA, que en oscuridad no modificaba en absoluto la actividad del enzima, actuaba como un efectivo inhibidor de la fotoconversión de la nitrato reductasa.

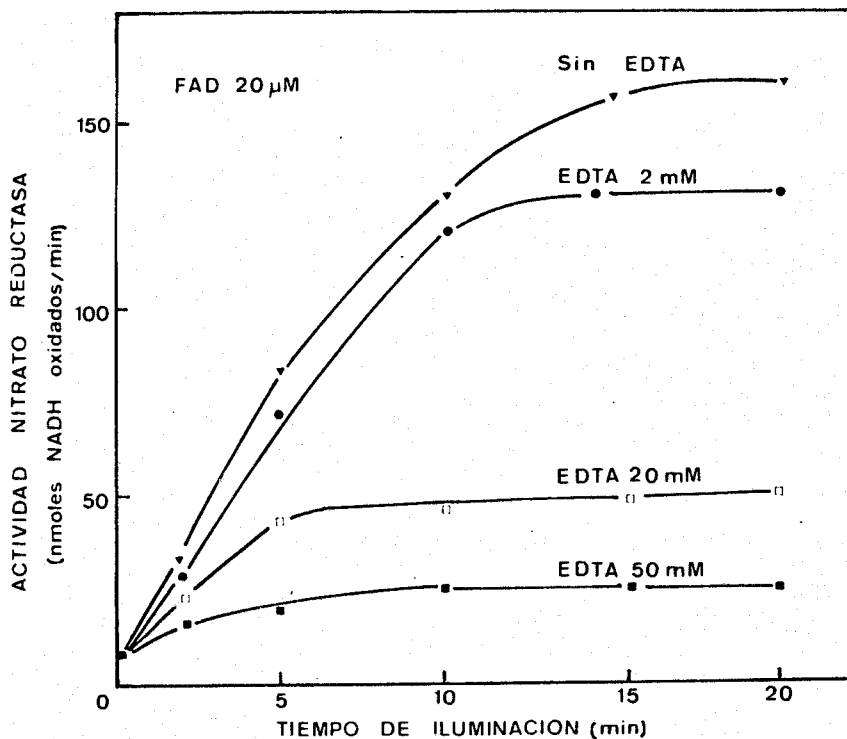


Figura 16.- EFECTO DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE EDTA SOBRE LA CINETICA DE REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ BLANCA, EN PRESENCIA DE FAD.

La preparación enzimática inactiva se iluminó en presencia de FAD 20 μ M y de las concentraciones de EDTA que se especifican. Nitrato reductasa, 1,2 mg.

11. EFECTO DEL IODURO POTÁSICO EN LA FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA

El ioduro potásico está descrito como un agente que inhibe las reacciones de los flavín-nucleótidos dependientes de la luz. Aunque el mecanismo de la inhibición no está totalmente elucidado se sugiere que el anión ioduro interacciona con el estado excitado de los flavín-nucleótidos provocando su vuelta al estado basal por disipación energética (Song, 1971).

La fotorreactivación de la nitrato reductasa de espinaca se inhibió al añadir a la mezcla de iluminación una concentración 5 mM de ioduro (Tabla VIII).

Como se observa en la Figura 17, la presencia de concentraciones crecientes de ioduro potásico en la mezcla de iluminación provocó un progresivo efecto inhibitor sobre la fotorreactivación de la nitrato reductasa.

TABLA VIII

EFFECTO DEL IODURO POTASICO EN LA REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ BLANCA EN PRESENCIA DE FAD

Adición	Iluminación (min)	Actividad nitrato rasa (nmoles NADH oxid./min)
Ninguna	0	4,85
Ninguna	15	77,64
IK	0	4,85
IK	15	12,12

La nitrato reductasa inactivada se iluminó en todos los casos en presencia de FAD 20 μ M y donde se indica, de IK 5 mM. Nitrato reductasa, 0,8 mg.

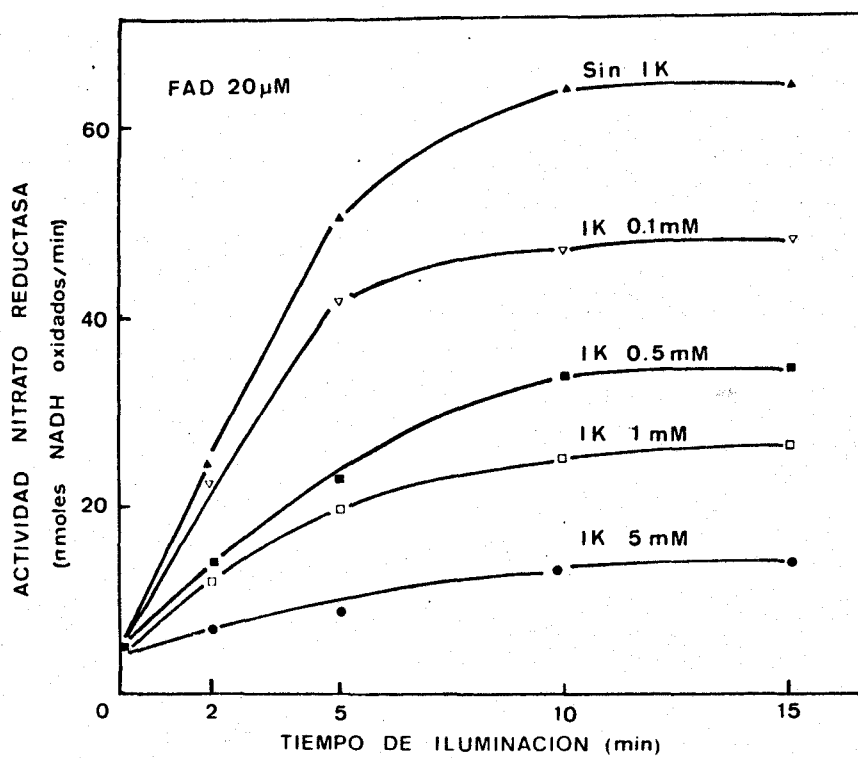


Figura 17.- CINETICA DE LA REACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA POR LUZ BLANCA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IK.

La preparación inactivada se iluminó en presencia de FAD 20 μ M y las concentraciones de IK que se indican en cada caso. Nitrato reductasa, 0,9 mg.

12. FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA EN PRESENCIA DE AMONIACO O FORMIATO

Ciertas fotorreacciones en que intervienen las flavinas incluyen la formación del radical libre hidroxilo que actúa como intermediario en la reacción. Para tratar de aclarar el posible papel de este radical en la fotoconversión de la nitrato reductasa, se iluminó una preparación inactiva en presencia de formiato, compuesto que al interaccionar rápidamente con el radical hidroxilo impide su participación en cualquier reacción posterior (Hodgson y Fridovich, 1976).

Los resultados expuestos en la Tabla IX muestran que el formiato no modificó la fotorreactivación de la nitrato reductasa, lo que en principio excluye la intervención del radical hidroxilo en el proceso.

En la misma tabla se observa que el amoniaco, agente inactivante in vivo, pero no in vitro, de la nitrato reductasa tampoco modificó el proceso de fotorreactivación.

TABLA IX

EFFECTO DEL AMONIACO Y EL FORMIATO SOBRE LA REACTIVACION POR LUZ BLANCA DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA EN PRESENCIA DE FAD

Adición	Actividad nitrato rasa (nmoles NADH oxid./min)	
	Oscuridad	5 min de iluminación
FAD	8,6	55,0
FAD + ClNH_4	8,6	61,0
FAD + Formiato	8,6	61,0

La nitrato reductasa inactiva se iluminó en presencia de FAD 20 μM y donde se indica, de ClNH_4 20 mM o formiato 40 mM. Nitrato reductasa, 0,6 mg.

13. FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DESPROVISTA DE LA ACTIVIDAD DIAFORASICA POR CALENTAMIENTO

Estaba establecido que la nitrato reductasa contiene FAD como uno de los componentes esenciales de su actividad NADH-diaforasa. Por otro lado, se conocía que el tratamiento térmico y los compuestos mercuriales eliminaban específicamente la actividad diaforasa sin afectar a la nitrato reductasa terminal. Por tanto era de gran interés estudiar el requerimiento de la funcionalidad de la actividad diaforásica del enzima en el proceso de la fotorreactivación.

Los resultados que se presentan en la Figura 18 muestran que, tanto en presencia como en ausencia de FAD exógeno, la cinética de fotorreactivación de un enzima al que se destruyó previamente por calentamiento la actividad diaforasa, era idéntica a la de una preparación sin calentar.

En estas condiciones no parece, por lo tanto, necesaria la funcionalidad de la actividad NADH-diaforasa para que tenga lugar la fotorreactivación de la nitrato reductasa terminal.

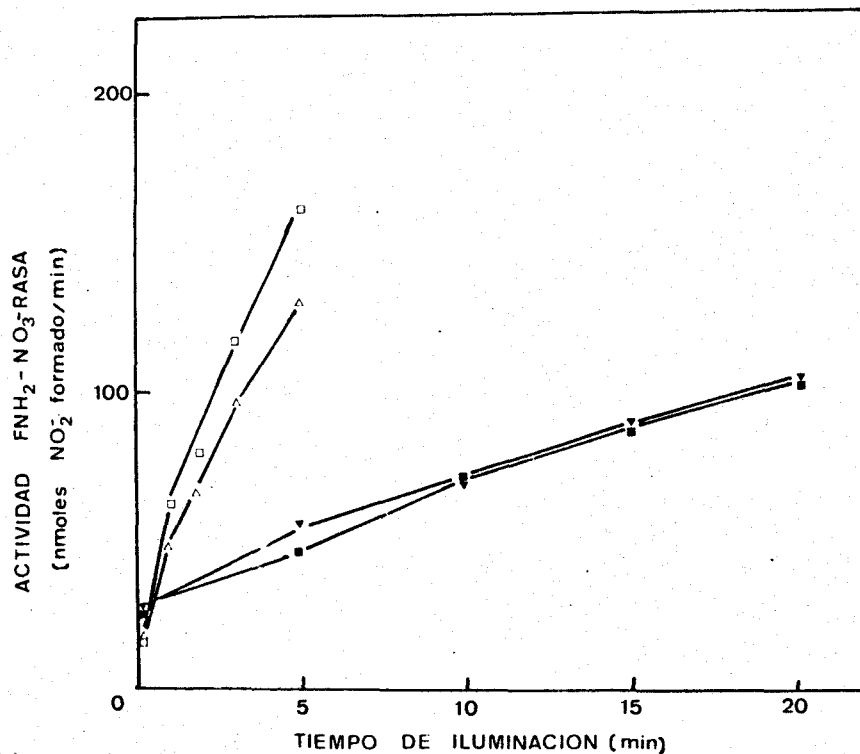


Figura 18.- FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA TERMINAL DE UN ENZIMA CARENTE DE ACTIVIDAD DIAFORASICA.

Una preparación inactivada se calentó a 50°C durante 10 min, con lo que su actividad NADH-diaforasa se redujo al 1% (Δ y ▽) y se iluminó con luz blanca usando como control una preparación inactiva sin calentar (□ y ■). La iluminación se realizó en presencia de FAD 20 μM (signos vacíos) y en su ausencia (signos llenos). Nitrato reductasa 1,0 mg.

14. FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella

La adición de amonio, producto final de la reducción asimilatoria del nitrato, a un cultivo de Chlorella produce la rápida inactivación de la nitrato reductasa terminal.

Puesto que los anteriores resultados habían sido obtenidos con el enzima de espinaca inactivado in vitro por adición de poder reductor y cianuro, era de máximo interés el estudio de la fotorreactivación de un enzima inactivado fisiológicamente.

Como se observa en la Tabla X, la iluminación de la nitrato reductasa de Chlorella, inactivada in vivo, dió lugar a una reactivación del mismo orden a la alcanzada tras la incubación con ferricianuro.

Asímismo, es notable que el enzima de Chlorella, altamente purificado e inactivado in vitro por poder reductor y cianuro, se reactivó con idénticas cinéticas que el de espinaca, al ser iluminado con luz blanca y azul, careciendo de efecto la luz roja (Fig. 19).

TABLA X

FOTOACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella INACTIVADA IN VIVO

Tratamiento	Actividad nitrato reductasa (nmoles NADH oxid./min)
Oscuridad	40,0
Luz blanca	110,0
Ferricianuro	115,0

La nitrato reductasa se inactivó in vivo como se describe en Materiales y Métodos. Las medidas de actividad se realizaron en alícuotas de 0,4 mg de proteína. Tiempo de iluminación: 10 min.

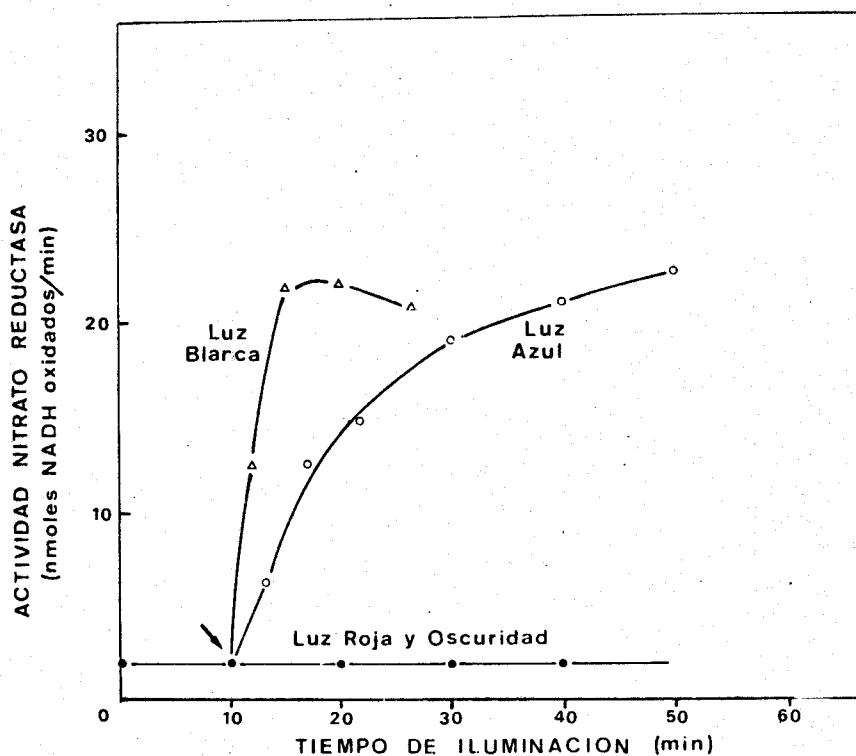


Figura 19.- FOTORREACTIVACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE Chlorella, INACTIVADA IN VITRO, EN PRESENCIA DE FAD.

La preparación inactivada con NADH y CNK se iluminó, en presencia de FAD 20 μ M, con luces de diferente longitud de onda. Nitrato reductasa, 0,3 mg.

IV DISCUSSION

La asimilación del nitrato y su regulación constituye uno de los procesos claves del metabolismo de las algas verdes y plantas superiores, que son los únicos organismos capaces de convertir la energía solar en otras formas de energía más manejables para la humanidad (Arnon, 1967; Losada, 1976; Ortega et al., 1976; Candau et al., 1976).

Ciertamente, el reino vegetal pone a disposición de la humanidad gran parte de los carburantes, ya sólidos o líquidos, que ésta utiliza y casi la totalidad de los alimentos que consume. Desde este punto de vista, la destacada importancia de la asimilación del nitrato se basa en dos razones fundamentales: 1^a) Para la mayoría de las algas y plantas superiores, el nitrato constituye la única fuente de nitrógeno utilizable por su maquinaria enzimática y 2^a) Las proteínas, alimento imprescindible en toda dieta animal, contienen un alto porcentaje de nitrógeno amínico que algunos casos alcanza el 25%.

La utilización de la energía solar por los organismos fotosintéticos ha sido intensamente estudiada en los últimos años, Al desencadenar a través del aparato fotosintético la rotura del agua, la luz suministra el poder reductor y el ATP necesarios para que estos organismos completen su ciclo vital de forma autótrofa, reduciendo el anhídrido carbónico, el nitrato y el sulfato, que entran así a formar

parte de carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. (Arnon, 1967).

La conexión entre los procesos fotosintéticos y la asimilación del nitrato ha sido también objeto de intensos estudios durante la última década y se ha demostrado que gran cantidad del poder reductor requerido en la reducción enzimática del nitrato es suministrado, en último término, por la maquinaria fotosintética. (Ramirez et al., 1964; Kessler y Zumft, 1973; Ortega et al., 1976; Candau et al., 1976; Manzano et al., 1976).

Así mismo, se ha estudiado el papel de la luz solar como agente regulador de muchos de los procesos metabólicos de los organismos fotosintéticos. En esta línea, se ha demostrado que la actividad de varios enzimas interconvertibles, importantes en el metabolismo del CO_2 , está controlada por el estado de óxido-reducción de la célula que está en definitiva regulado por la luz. (Losada, en prensa).

El primer enzima de este tipo es la ribulosa-1,5 difosfato carboxilasa que cataliza la incorporación de CO_2 al material celular mediante la carboxilación de la ribulosa 1,5 difosfato. Se ha descrito la activación de este enzima bajo iluminación intensa en extractos crudos de diversos organismos (Jensen y Bassham, 1968) y se postuló la existencia de un factor activador de naturaleza protéica, sensible a la luz, al que se asignó un papel importante en la regu-

lación de diversos procesos fotosintéticos (Wildner y Criddle, 1969). Por otro lado, se encontró en espinaca que la ribulosa-1,5 difosfato carboxilasa está formada por dos subunidades, habiéndose postulado que una de ellas tendría a su cargo la catálisis enzimática, mientras que la otra sería la responsable de las propiedades reguladoras, donde la luz desempeñaría un papel destacado (Rutner y Lane, 1967).

También la gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa, que cataliza el paso de ácido 1-3-difosfoglicérico a 3-fosfogliceraldehido, está sometida a un mecanismo de regulación por la luz. Existen dos formas de este enzima: una dependiente de NAD^+ , que se encuentra en tejidos con o sin clorofila y otra dependiente NADP^+ que está presente únicamente en tejidos con clorofila. La forma dependiente de NADP^+ está implicada en la conversión de ácido 1-3-difosfoglicérico en triosa-fosfato, en el ciclo de las pentosas-fosfato y la dependiente de NAD^+ tiene su función en la vía degradativa de la glucólisis.

Tanto en semillas de guisantes (Hageman y Arnon, 1955) como en Euglena gracilis (Brawerman y Konigsberg, 1960) y Chlamydomonas reinhardtii (Fuller y Hudock, 1967) no aparece actividad dependiente de NADP^+ cuando se mantienen estos organismos en oscuridad. Pero si las células cultivadas en oscuridad se pasan a la luz, aparece la actividad dependiente de NADP^+ mientras que la de NAD^+ sufre un marcado descen

so. De acuerdo con estos resultados se ha sugerido la existencia de una interconversión entre la forma dependiente de NAD^+ y la dependiente de NADP^+ , producida por la luz. Sin embargo, la conversión de una forma en la otra se ha llevado a cabo in vitro por efecto del NADPH en lugar de la luz (Muller et al., 1969). Ultimamente se ha observado que el DTE, por sí solo, es capaz de transformar la forma dependiente de NADP^+ en la dependiente de NAD^+ (Anderson y Lim, 1972).

Otro de los enzimas que intervienen en la ruta de asimilación del CO_2 y que está sometido a un mecanismo de regulación por la luz es la fructosa difosfatasa, cuya actividad en células de Euglena gracilis cultivadas en la oscuridad es muy pequeña, pero que aumenta de modo paralelo a la formación de clorofila cuando se pasa a la luz (Smillie, 1964). Sin embargo, se ha demostrado que el enzima de espinaca se activa de 7 a 10 veces cuando se añadía ferredoxina reducida a un extracto conteniendo la fructosa difosfatasa (Buchanan et al., 1968).

Por último, la ribulosa 5-fosfato quinasa puede ser activada por la luz en tejidos de espinaca, aunque la activación se puede llevar a cabo in vitro con DTE, pero no con NADPH (Latzko et al., 1970).

En el presente trabajo se describe por primera vez la regulación, in vitro, por la luz de la nitrato reductasa,

enzima implicado en la vía asimilativa del nitrato. A diferencia de la mayoría de los enzimas de la ruta del CO_2 antes enumerados, en los que la activación del enzima se debe a la reducción del mismo, la reactivación de la nitrato reductasa se produce por oxidación de la proteína que probablemente está provocada por la excitación luminosa del componente flavínico.

La naturaleza interconvertible de la nitrato reductasa se estableció a raíz de los resultados obtenidos recientemente en nuestro Departamento. La sobrerreducción de la proteína in vitro por piridín-nucleótidos reducidos, en presencia o ausencia de cianuro, motivaba la inactivación del enzima. En algas verdes se estableció un marcado paralelismo entre este fenómeno, estudiado in vitro, y la inactivación que in vivo promueve la adición de amonio a la solución nutritiva de las células.

La reactivación del enzima se consiguió in vitro por la acción de un oxidante no fisiológico, el ferricianuro, o in vivo por la eliminación del amonio añadido al cultivo de células.

Al ser el ferricianuro un agente afisiológico, se han llevado a cabo gran número de estudios tratando de aclarar el agente fisiológico responsable de esta reactivación.

Así, la reactivación del enzima se obtuvo in vitro: por

exposición al aire durante varias horas a baja temperatura (Losada et al., 1970), por incubación con nitrato y fosfato a pH bajo (Vennesland y Jetchmann, 1971), por calentamiento a 75°C, por tratamiento con fosfato, urea y PMB (Rigano, 1971) y por incubación con flavinas (De la Rosa et al., 1976).

Pero ninguno de estos resultados ha sido suficientemente concluyente para explicar la reactivación fisiológica del enzima pues o bien se obtuvieron reactivaciones parciales, o hubo que esperar varias horas para obtener la reactivación total.

Por ser la nitrato reductasa un enzima que posee como componente de la molécula FAD y citocromo, sustancias ambas coloreadas, y estar incluido en una ruta metabólica conectada con la fotosíntesis, el estudio del posible efecto de la luz como regulador de su actividad se presentaba prometedor. En el presente trabajo se presentan los resultados que demuestran la existencia de la conversión de la nitrato reductasa inactiva en su forma activa merced al efecto de la radiación luminosa de una longitud de onda determinada.

Solomonson et al. (1975) habían descrito la existencia del citocromo b₅₅₈ en la nitrato reductasa de Chlorella, pero se desconocía su existencia en el enzima de espinaca.

Nuestros resultados demuestran que también la nitrato reductasa de espinaca presenta citocromo b₅₅₈ como componente esencial de su cadena de transporte electrónico.

Hodler et al. (1972) publicaron que los niveles internos de la actividad nitrato reductasa de células de Chlorella, experimentaban un rápido y drástico descenso al someter el cultivo a la oscuridad, siendo el proceso de naturaleza reversible. De estos hechos no se podía concluir que la luz actuara directamente sobre el enzima y fuera la causa inmediata de la modificación de los niveles de la actividad, puesto que el cambio de luz a oscuridad afecta de forma generalizada al metabolismo de estos organismos. Sin embargo, los resultados del presente trabajo demuestran que la luz, actuando directamente sobre preparaciones parcialmente purificadas de nitrato reductasa, previamente tratadas con NADH y CNK, que contenían el enzima en su forma inactiva da lugar a la restauración total de su actividad.

Se había descrito el efecto inhibitor del CO sobre la reactivación de la nitrato reductasa causada por el oxígeno molecular, así como la desaparición del efecto inhibitor del monóxido de carbono al iluminar la preparación (Jetschmann et al., 1972). A partir de estos resultados, estos autores interpretaron que la luz actuaría rompiendo el complejo CO-enzima, lo que permitiría la posterior reoxidación de la proteína por el oxígeno molecular. No obstante, nuestros

experimentos parecen apoyar la idea de que la función de la luz es reoxidar directamente el enzima provocando su reactivación, dando lugar a la liberación del cianuro, ya que el enzima oxidado pierde totalmente su afinidad por este compuesto.

La adición de flavina exógena disminuye marcadamente el tiempo necesitado para la fotorreactivación (Fig. 4). De la Rosa et al. (1976) describieron el papel de las flavinas, per se, como agentes reactivadores de la nitrato reductasa, aunque la reactivación total del enzima requería su incubación durante varias horas con concentraciones relativamente elevadas de estos compuestos. Dado que en nuestros experimentos la nitrato reductasa no se reactiva en absoluto al permanecer en la oscuridad en presencia de flavín-nucleótidos, es muy probable que en las condiciones de trabajo de estos autores interviniera precisamente la luz como agente reactivador del enzima, aunque siendo factor limitante por realizarse el proceso de reactivación a la luz ambiente. Las flavinas actuarían en este caso como agentes potenciadores del proceso de fotorreactivación.

La reactivación en presencia de FMN es más rápida que en presencia de FAD, aunque la actividad desciende marcadamente en presencia de aquella sustancia una vez alcanzado el nivel original de actividad. La explicación de este hecho requiere estudios más profundos que aporten evidencias concluyentes

sobre el mecanismo de acción de ambas sustancias en el proceso de fotorreactivación de la nitrato reductasa.

La reactivación del enzima por diferentes tipos de luz en presencia de FAD exógeno es, salvo en que disminuye el tiempo necesitado para alcanzar el nivel original de actividad, semejante a la fotorreactivación sin adiciones (Fig. 5). Cabe pensar, por tanto, que la adición de flavina exógena no introduce ningún artefacto en el proceso de fotorreactivación, sino que -transmitiendo probablemente por interacción intermolecular su estado fotoexcitado al FAD endógeno del enzima- lo acelera y amplifica al potenciar el papel que este FAD del enzima realiza en el proceso. Esta idea es corroborada por el hecho de que en nuestras condiciones de iluminación, fueron catalíticas ($10 \mu\text{M}$) las concentraciones de FAD exógeno requeridas para alcanzar la máxima velocidad de fotorreactivación (Fig. 6).

Por lo tanto, parece segura la actuación del FAD del enzima como pigmento antena en el proceso de fotorreactivación; al absorber la luz azul desencadena las reacciones que en última instancia darán lugar a la oxidación del enzima.

La actividad de una preparación enzimática, total o parcialmente fotorreactivada, no se modifica al ser sometida a oscuridad, lo que nos permite hablar de fotoconversión de la forma inactiva de la nitrato reductasa en su forma activa (Fig. 7).

Muñoz y Butler (1975) demostraron, sin embargo, la reversibilidad de la fotorreducción por luz azul del citocromo b en micelios de Neurospora. Nuestro trabajo se centra en los cambios inducidos por la luz en la actividad enzimática, ya que hasta ahora no ha sido posible seguir los cambios en el estado de óxido-reducción de los grupos prostéticos de la nitrato reductasa. Desde este enfoque, no parece aventurado predecir que algunos de los componentes de la nitrato reductasa (FAD o/y citocromo b₅₅₈) sufran, por efecto de la luz actínica, cambios en su estado re-dox que estarían relacionados con la actividad del enzima.

Se había descrito la reactivación de la nitrato reductasa en presencia de nitrato, durante el ensayo de actividad (Moreno et al., 1972), así como la reactivación del enzima a bajo pH en presencia de nitrato (Vennesland y Jetschmann, 1971). En nuestras condiciones, el nitrato no tuvo ningún efecto sobre la fotorreactivación del enzima, tanto en presencia como en ausencia de FAD exógeno.

La fotorreactivación de la nitrato reductasa es dependiente del pH (Fig. 9). Es interesante destacar que, siendo los pHs 8-9 los óptimos para la inactivación del enzima por reducción (Moreno et al., 1972), el proceso de fotorreactivación se favorece especialmente a pHs más bajos; 6-7, lo que está de acuerdo con los resultados del grupo de Vennes

land, al reactivar el enzima a pH ácido en presencia de oxidantes.

El proceso fotorreactivante depende de la temperatura tanto en presencia como en ausencia de FAD exógeno (Tabla II, Fig. 10), lo que parece indicar que, una vez excitado el FAD del enzima por la luz, la reacción de fotorreactivación incluye la actuación de varios componentes.

Está actualmente bien establecido que la inactivación in vivo de la nitrato reductasa de algas verdes está producida por la adición de amonio al medio de cultivo. Este hecho se explica por el aumento de poder reductor (formación de NAD(P)H) y la disminución de la carga energética de la célula (aumento de ADP), procesos en los que la luz no parece tener un efecto directo (Chaparro et al., 1976). Por otro lado, se ha descrito que la inactivación de la nitrato reductasa de organismos no fotosintéticos, como Nitrobacter agilis, tiene lugar por medio de la sobrerreducción del enzima con NADH y es revertida por oxidación de la proteína con NAD(P) (Herrera y Nicholas, 1974).

La adición de piridín-nucleótidos oxidados y adenín-nucleótidos a una preparación inactiva de nitrato reductasa, no trajo consigo ninguna variación en el proceso de reactivación por luz azul (Tabla IV). El ligero efecto potenciador de la reactivación por luz blanca, realizado por el AMP o el ADP (Tabla III), es quizás debido a que este tipo de

luz contenga radiaciones de corta longitud de onda, capaces de excitar a estos nucleótidos en su banda de absorción del ultravioleta.

De cualquier forma, los resultados obtenidos no son suficientemente significativos para atribuir, al menos en nuestras condiciones, un papel destacado a los piridín-nucleótidos oxidados y adenín-nucleótidos en el proceso de fotorreactivación de la nitrato reductasa.

En el estudio de la regulación del enzima, es un dato importante la inhibición del proceso de fotorreactivación por los piridín-nucleótidos reducidos. La presencia de NAD(P)H en la mezcla de iluminación impedía la fotorreactivación en los primeros minutos del proceso (Tablas VI y VII). Al oxidarse completamente el NAD(P)H comenzó la fotoactivación del enzima (Fig. 13).

En 1956, Stoy atribuyó a las flavinas un papel importante en la reducción de nitrato inducida por luz azul. Así, según este autor, en anaerobiosis, la fotoexcitación de las flavinas da lugar a la oxidación del agua, siendo las mismas flavinas intermediarias en el transporte de electrones desde el agua hasta el nitrato. En la misma línea, Ver non (1959) estudió las reacciones fotoquímicas catalizadas por las flavinas. En aerobiosis, el NADH es oxidado químicamente por el FMN o el FAD excitados por la luz. En anae-

robiosis, las flavinas fotoexcitadas son capaces de mediar en la fotorreducción del citocromo c a partir del NADH.

Por tanto, se puede afirmar que en el proceso que se describe en este trabajo los piridín-nucleótidos reducidos mantienen el enzima reducido, y por tanto inactivo, debido a su gran afinidad por la proteína, impidiendo además su fotoactivación al interaccionar con las flavinas. De esta forma, al reducir fotoquímicamente al FAD, dan lugar a la desaparición de su estado excitado, que es probablemente la causa primaria de la fotoconversión de la nitrato reductasa en su forma activa.

La fotorreactivación de la nitrato reductasa en presencia de NAD(P)H sigue cinética sigmoideal (Fig. 11 y 12) a diferencia de la cinética hiperbólica observada al iluminar en ausencia de los piridín-nucleótidos reducidos. La presencia de nitrato en la mezcla de iluminación disminuye el tiempo de latencia de la reactivación cuando el nucleótido presente es NADH (Fig. 14), pero no modifica significativamente la sigmoide en el caso del NADPH (Fig. 15).

Moreno et al. (1972) describieron la reactivación de la nitrato reductasa durante su ensayo de actividad, esto es; en presencia de NADH y nitrato, observando una cinética sigmoideal con la que concuerdan nuestros resultados. En el citado trabajo no se hace referencia a la luz como factor res

ponsable de la reactivación, pero teniendo en cuenta la evidencia actual, es altamente probable que la luz interviniera efectivamente en el proceso reactivante aunque de una forma no controlada.

El hecho de que el nitrato acelere la reactivación del enzima en presencia de NADH pero no de NADPH demuestra que en presencia de la fracción creciente de enzima fotorreactivado, el nitrato actúa como agente oxidante del NADH a través del enzima, acelerando así su desaparición de la mezcla de iluminación. El NADPH, al no ser donador fisiológico de electrones de la nitrato reductasa de espinaca, no puede ser oxidado enzimáticamente por el nitrato y por tanto la desaparición del NADPH, condición necesaria para la reactivación del enzima, no se acelera en presencia de este oxidante.

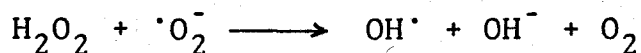
El EDTA juega un papel inhibitor en la fotorreactivación por un mecanismo semejante al realizado por los piridín-nucleótidos reducidos (Fig. 16). Se puede sugerir que la fotorreactivación se realiza mediante la oxidación de algunos componentes de la proteína por la flavina excitada. La presencia de EDTA o de los nucleótidos reducidos podría por otro lado inhibir la fotorreactivación al suministrar electrones a la flavina de forma que, manteniéndola continuamente reducida, no pueda oxidar a los componentes del enzima cuyo estado reducido determina la forma inactiva de la

nitrate reductase.

While reduced pyridine nucleotides and EDTA impede the photoreactivation by reducing the photoexcited FAD, the iodide anion seems to act at another level: it decreases the concentration of flavin in the excited state by interacting with the pigment and accelerating its energy dissipation. The strong inhibitory effect of this compound (Table VIII, Fig. 17) supports the idea of the action of flavin nucleotides as antenna pigments, or energy absorbers of the luminous energy that serves to initiate the photoreactivation process.

The mechanism by which flavins, once excited by blue light, interact with the protein fraction of the flavoenzyme is still unclear. The existence of non-flavin intermediates in the reactions catalyzed by flavoenzymes has been investigated during the last few years. In the case of xanthine oxidase, it has been postulated that the two reduced forms of flavin, semiquinone and fully reduced, react with oxygen to give superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$) and hydrogen peroxide (Misra and Fridovich, 1972).

These two compounds can react according to the Haber-Weiss scheme:



El resultado es la formación del radical hidroxilo (OH'), uno de los más potentes agentes oxidantes que se conocen (Hodgson y Fridovich, 1976).

El radical hidroxilo no parece actuar en la fotorreactivación de la nitrato reductasa pues la presencia de formiato, que impide la acción del radical, no motivó ninguna modificación en el proceso (Tabla IX). Por otro lado, la adición de H_2O_2 a una preparación inactivada no alteró en absoluto su actividad.

Según el esquema que se propone en la Figura 20, la forma excitada de la flavina es capaz de oxidar al grupo o grupos del enzima que al estar reducidos determinan la forma inactiva del mismo. Actualmente se están realizando experimentos para aclarar la posible actuación del oxígeno molecular como aceptor último de electrones en el proceso.

Moreno et al, (1972), reportaron la necesidad de la funcionalidad de la actividad diaforasa para la inactivación por reducción de la nitrato reductasa terminal. Por el contrario, nuestros resultados muestran que la fotorreactivación es independiente de la existencia de actividad diaforásica.

La nitrato reductasa de Chlorella inactivada in vitro, se reactiva por la luz de idéntica forma que la de espinaca. Por tanto, el proceso de reactivación parece ser general en los organismos fotosintéticos eucarióticos.

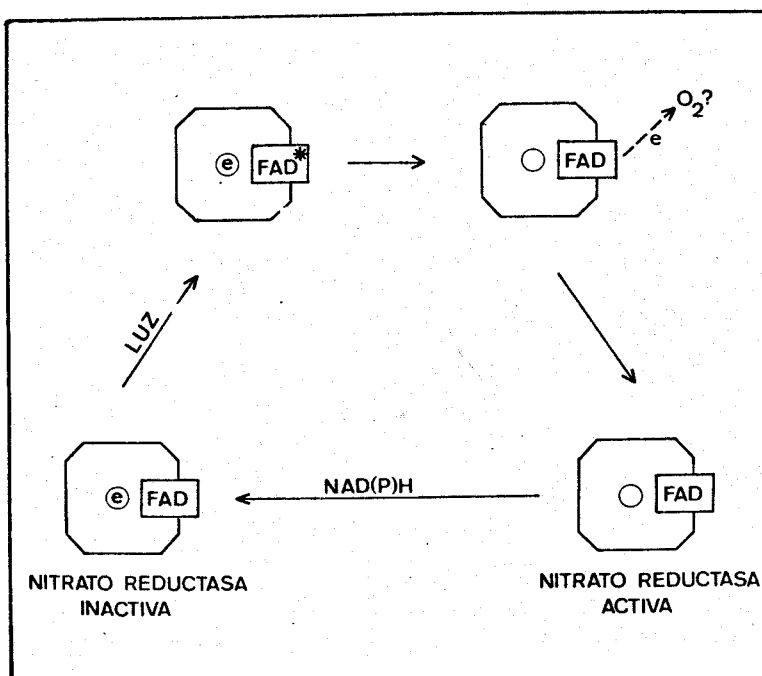


Figura 20.- ESQUEMA DEL MECANISMO DE LA FOTOINTERCONVERSION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ALGAS VERDES Y PLANTAS SUPERIORES.

El enzima activo se sobrerreduce por la acción del NAD(P)H pasando a su forma inactiva. La luz azul excita al FAD del enzima que en este estado es capaz de oxidar a la proteína, dando lugar a la fototransformación de la nitrato reductasa en su forma activa. Probablemente el oxígeno molecular es el aceptor final de electrones en este proceso.

Es de máximo interés la fotorreactivación del enzima de Chlorella inactivado in vivo por el amonio, puesto que indica que este mecanismo de reactivación puede tener un alto sentido fisiológico, al operar in vivo la luz azul como uno de los agentes moduladores de la reducción del nitrato.

En esta línea se están llevando a cabo experimentos con cultivos de células para documentar adecuadamente este aspecto del proceso descrito en el presente trabajo.

V CONCLUSIONES

- 1.- La nitrato reductasa de espinaca contiene citocromo b_{558} como componente funcional de su cadena de transporte electrónico.
- 2.- La luz blanca y la azul, pero no la roja, reactivan el enzima previamente inactivado por NADH y cianuro.
- 3.- La adición de flavinas a la preparación inactiva, potencia el proceso de fotorreactivación al amplificar la función que el FAD endógeno del enzima realiza en el mismo.
- 4.- El FMN acelera en mayor grado el proceso que el FAD, pero en presencia del primero la actividad del enzima, una vez fotorreactivado, experimenta un marcado descenso.
- 5.- La fotorreactivación de la nitrato reductasa de espinaca en presencia de FAD exógeno sigue cinéticas semejantes a las de la fotorreactivación sin adiciones.
- 6.- El FAD endógeno del enzima actua como pigmento colector de luz azul.
- 7.- Por su caracter irreversible, la fotorreactivación de la nitrato reductasa se puede considerar una fotoconversión de la forma inactiva del enzima en su forma activa.

- 8.- El nitrato, por sí solo, no modifica en absoluto la cinética de la fotorreactivación del enzima de espinaca.
- 9.- La reactivación por luz del enzima se favorece especialmente a pH ácido, aproximadamente entre 6 y 7.
- 10.-El proceso fotorreactivante es dependiente de la temperatura.
- 11.-En nuestras condiciones, los piridín-nucleótidos oxidados y adenín-nucleótidos no parecen ejercer un efecto significativo en la reactivación de la nitrato reductasa.
- 12.-La fotorreactivación en presencia de piridín-nucleótidos reducidos comienza después de una fase de latencia, una vez que estos compuestos han sido totalmente fotooxidados.
- 13.-La reactivación por luz en presencia de NAD(P)H sigue una cinética sigmoïdal a diferencia de la hiperbólica observada al iluminar en ausencia de estos compuestos.
- 14.-El nitrato acelera más acentuadamente el proceso de fotorreactivación en presencia de NADH que en presencia de NADPH.
- 15.-El EDTA, al reducir a la flavina fotoexcitada, inhibe el proceso de fotorreactivación de la nitrato reductasa.

- 16.-El ioduro, al acelerar la disipación energética del FAD fotoexcitado, inhibe asimismo la reactivación del enzima por la luz.
- 17.-En el proceso de fotorreactivación no parece actuar el radical hidroxilo como intermediario.
- 18.-El amoniaco no tiene efecto en el proceso de fotoactivación realizado in vitro.
- 19.-La reactivación por luz de la nitrato reductasa terminal es independiente de la funcionalidad de la actividad diaforasa.
- 20.-La nitrato reductasa de Chlorella, inactivada in vitro por poder reductor y cianuro, se fotorreactiva de idéntico modo que la de espinaca.
- 21.-El enzima de Chlorella inactivado in vivo por amonio se reactiva por la luz.
- 22.-El mecanismo propuesto para la reactivación incluye la fotoexcitación del FAD que oxida al grupo -o grupos del enzima que al estar reducidos determinan la forma inactiva del mismo.

VI BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, L.E. y LIM, T. (1972). FEBS Letters, 27, 189-191.
2. APARICIO, P.J., PANEQUE, A., RODRIGUEZ-LOPEZ, M. y LOSADA, M. (1969). Anal. Aula Dei, 10, 744-759.
3. APARICIO, P.J. (1971). Anales de la Universidad Hispalense, Serie Ciencias, num. 13.
4. APARICIO, P.J., ROLDAN, J.M. y CALERO, F. (1976). Biochem. Biophys. Res. Commun., 70, 1071-1077.
5. *APARICIO, P.J., ROLDAN, J.M., CALERO, F. y Mc SWAIN, B.D. (1976). VII International Congress on Photobiology, Roma.
6. **APARICIO, P.J., ROLDAN, J.M. y CALERO, F. (1976). I Congreso de la FESBE, Madrid.
7. ARNON, D.I. (1967). Physiol. Rev., 47, 317.
8. BAREA, J.L., MALDONADO, J.M. y CARDENAS, J. (1975). Physiol. Plant., 36, 325-332.
9. BEEVERS, L. y HAGEMAN, R.H. (1969). Ann. Rev. Plant Physiol., 20, 495-522.
10. BRAWERMAN, G. y KONIGSBERG, N. (1960). Biochim. Biophys. Acta, 43, 374-381.
11. BRIGGS, W.R. y RICE, H.V. (1972). Ann. Rev. Plant. Physiol., 23, 293-334.
12. BRUCE, V.G. y MINIS, D.H. (1969). Science, 168, 583-585.
13. BUCHANAN, B.B., KALBERER, P.P. y ARNON, D.I. (1968). Fed. Proc., 27, 244.
14. BURNS, R.C. y HARDY, R.W.F. (1975), en "Nitrogen Fixation in Bacteria and Higher Plants", p. 47, Springer-Verlag, New York.

15. CANDAU, P., MANZANO, C. y LOSADA, M. (1976). *Nature*, 262, 715-717.
16. CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F. y PALACIAN, E. (1975). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 64, 546-552.
17. CHIBA, S. e ISHIMOTO, M. (1975). *J. Biochem.*, 73, 1315-1318.
18. CURRY, G.M. y THIMANN, K.V. (1961), en "Progress in Photobiology", p. 127-134, editado por B.C. CHRISTENSEN y B. BUCHMAN. Elsevier Publishing Co., Amsterdam.
19. DE LA ROSA, F.F. (1975). Tesis Doctoral, Anales de la Universidad Hispalense, Serie Ciencias.
20. DE LA ROSA, F.F., CASTILLO, F., MENDEZ, J.M. y PALACIAN, E. (1976). *FEBS Letters*, 64, 293-295.
21. DIEHN, B. (1969). *Biochim. Biophys. Acta*, 177, 136-143.
22. FRANK, K.D. y ZIMMERMAN, W.F. (1969). *Science*, 163, 688-689.
23. FULLER, R.C. y HUDOCK, G.A. (1967), en "Biochemistry of Chloroplasts", vol II, p. 181-190. editado por T.W. GOODWIN. Academic Press, New York.
24. GARRET, R.H. y NASON, A. (1969). *J. Biol. Chem.*, 244, 2870-2882.
25. GARRET, R.H. y GREENBAUM, P. (1973). *Biochim. Biophys. Acta*, 302, 24-32.
26. GUERRERO, M.G., VEGA, J.M. y LOSADA, M. (1973). *Arch. Mikrobiol.*, 91, 287-304.
27. HAGEMAN, R.H. y ARNCN, D.I. (1955). *Arch. Biochem.*, 57, 421-436.
28. HAGEMAN, R.H. y HUCKLESBY, D.P. (1971), en "Methods in Enzy-

- mology", vol 23, p. 491-503, editado por A. SAN PIETRO. Academic Press, New York.
29. HATTORI, A. y UESUGI, I. (1968), en "Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis", p. 201, editado por K. SHIBATA, A. TAKAMIYA, A.T. JAGENDORF y R.C. FULLER, University of Tokyo Press.
 30. HAUPT, E. (1970). Ber. Deut. Bot. Ges., 83, 201-203.
 31. HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L. y LOSADA, M. (1972). Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 996-1003.
 32. HERRERA, J. y NICHOLAS, D.J.D. (1974). Biochim. Biophys. Acta, 368, 54-60.
 33. HEWITT, E.J. (1975). Ann. Rev. Plant Physiol., 26, 73-100.
 34. HODGSON, E.K. y FRIDOVICH, I. (1976). Arch. Biochem. Biophys., 172, 202-205.
 35. HODLER, M., MORGENTHALER, J.J., EICHENBERGER, W. y GROB, E.C. (1972). FEBS Letters, 28, 19-21.
 36. JENSEN, R.G. y BASSHAM, J.A. (1968). Biochim. Biophys. Acta, 153, 227-234.
 37. JETSCHMANN, C., SOLOMONSON, L.P. y VENNESLAND, B. (1972). Biochim. Biophys. Acta, 275, 276-278.
 38. KEERBERG, J., KEERBERG, O., PARNIK, T., VIIL, J. y VARK, E. (1971). Photosynthetica, 5, 99-106.
 39. KESSLER, E. y CZYGAN, F.C. (1970). Arch. Mikrobiol., 70, 211-216.

40. KESSLER, E. y ZUMFT, W.G. (1973). *Planta*, 111, 41-46.
41. KOWALLIC, W. (1967). *Plant. Physiol.*, 42, 672-676.
42. KOWALLIC, W. (1969). *Planta*, 87, 372-384.
43. KRASNOVSKII, A.A. y MICHAILOVA, E.S. (1970). *Dokl. Akad. Nauk SSSR*, 194, 953-956.
44. LATZKO, E., GARNIER, R. y GIBBS, M. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39, 1140-1144.
45. LORIMER, G.H., GEWITZ, H.S., WOLKER, W., SOLOMONSON, L.P. y VENNESLAND, B. (1974). *J. Biol. Chem.*, 249, 6.024-6.079.
46. LOSADA, M. y ARNON, D.I. (1963), en "Metabolic Inhibitors", vol II, p. 559, editado por R.H. HOCHSTER y J.H. QUASTEL. Academic Press, New York.
47. LOSADA, M., APARICIO, P.J. y PANEQUE, A. (1969), en "Progress in Photosynthesis Research", vol III, p. 1.504-1.509, editado por H. METZNER, Institut fur Chemische Pflanzenphysiologie, Tubingen.
48. LOSADA, M. PANEQUE, A., APARICIO, P.J., VEGA, J.M., CARDENAS, J. y HERRERA, J. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 38, 1.009-1.015.
49. LOSADA, M. (1972). "La Fotosíntesis del Nitrógeno Nítrico". Real Academia de Ciencias, Madrid.
50. LOSADA, M., HERRERA, J., MALDONADO, J.M. y PANEQUE, A. (1973). *Plant Sci. Letters*, 1, 31-37.
51. LOSADA, M. (1973), en "Metabolic Interconversion of Enzymes", p. 257, editado por E.H. FISCHER, E.G. KREBS, H. NEURATH y E.R. STADMAN. Springer-Verlag, Berlin.

52. LOSADA, M. (en prensa), en "Reflections in Biochemistry", editado por A. KORNBERG, B.L. HORECKER y J. ORO. Pergamon Press, Oxford.
53. LOSADA, M. (1976). *Journal of Molecular Catalysis*, 1, (1975/76), 245-264.
54. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
55. MALDONADO, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 51, 27-33.
56. MANZANO, C., CANDAU, P., MORENO, C.G., RELIMPIO, A.M. y LOSADA, M. (1976). *Mol. Cell. Biochem.*, 10, 161-169.
57. Mc KORMICK, D.B. (1968), en "Flavins and Flavoproteins", p. 154, editado por K. YAGI. University of Tokyo Press.
58. MEYER, V. y SCHULZE, E. (1894). *Ber.*, 17, 1554.
59. MISRA, H.P. y FRIDOVICH, I. (1972). *J. Biol. Chem.*, 247, 188-192.
60. MORENO, C.G., APARICIO, P.J., PALACIAN, E. y LOSADA, M. (1972). *FEBS Letters*, 26, 11-14.
61. MULLER, B., ZIEGLER, I. y ZIEGLER, H. (1969). *Eur. J. Biochem.*, 9, 101-106.
62. MUÑOZ, V. y BUTLER, W. (1975). *Plant Physiol.*, 55, 421-426.
63. OREBAMJO, T.O. y STEWART, G.R. (1975). *Planta*, 122, 37-44.
64. ORTEGA, T., CASTILLO, F. y CARDENAS, J. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 71, 885-891.

65. PANEQUE, A., DEL CAMPO, F.F., RAMIREZ, J.M. y LOSADA, M. (1965). *Biochim. Biophys. Acta*, 109, 79-85.
66. PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1966). *Biochim. Biophys. Acta*, 126, 578-580.
67. PANEQUE, A., APARICIO, P.J., CATALINA, L. y LOSADA, M. (1968). *Biochim. Biophys. Acta*, 162, 149-151.
68. POFF, K. y BUTLER, W. (1975). *Plant. Physiol.*, 55, 427-429.
69. RAMIREZ, J.M., DEL CAMPO, F.F., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1964). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 15, 297.
70. RAU, W. (1967). *Planta*, 72, 14-28.
71. RELIMPIO, A.M., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. (1971). *FEBS Letters*, 17, 225-230.
72. RIGANO, C. (1971). *Arch. Mikrobiol.*, 76, 265-276.
73. RUTNER, A.C., y LANE, M.D. (1967). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28, 531-537.
74. SARGENT, M. y BRIGGS, W.R. (1967). *Plant Physiol.*, 42, 1.504-1.510.
75. SCHMID, G.H. (1969). *Z. Physiol. Chem.*, 350, 1.035-1.046.
76. SIEGFRIED, H., LORIMER, G.H., SOLOMONSON, L.P. y VENNESLAND, B. (1974). *Nature*, 249, 78-91.
77. SMILLIE, R.M. (1964). *Can. J. Bot.*, 41, 123-134.
78. SNELL, E.D. y SNELL, C.T. (1949). em "Colorimetric Methods of Analysis", p. 804. D. Van Nostrand Company, Academic Press, New York.

79. SOLOMONSON, L.P., LORIMER, G.H., HALL, R.L., BORCHERS, R. y BAILEY, J.L. (1975). *J. Biol. Chem.*, 250, 4.120-4.127.
80. SONG, P.S. (1971), en "Flavins and Flavoproteins", p. 37, editado por H. KAMIN. University Park Press, Baltimore, Butterworth and Co., London.
81. STOY, V. (1955). *Physiol. Plant.*, 8, 963-986.
82. SUBRAMANIAN, K.N. y SORGER, G.J. (1972). *J. Bacteriol.*, 110, 538-546.
83. TOLLIM, G. y ROBINSON, M.I. (1969). *Photochem. Photobiol.*, 9, 441-450.
84. TORTOLERO, M., VILA, R. y PANEQUE, A. (1975). *Plant Sci. Lett.*, 5, 141-145.
85. VEGA, J.M., HERRERA, J., RELIMPIO, A.M. y APARICIO, P.J. (1972). *Physiol. Veg.*, 10, 637-651.
86. VEGA, J.M., GUERRERO, M.G., LEADBETTER, E. y LOSADA, M. (1973). *Biochem. J.*, 133, 701-708.
87. VENNESLAND, B. y JETSCHMANN, C. (1971). *Biochim. Biophys. Acta*, 229, 554-564.
88. VERNON, L.P. (1959). *Biochim. Biophys. Acta*, 36, 177-185.
89. VOSKRESENSKAYA, N.P. y OSHMAROVA, I.S. (1969), en "Progress in Photosynthesis Research", p. 1.669-1.674, editado por H. METZNER. Goldmann-Verlag, Munich.
90. VOSKRESENSKAYA, N.P. (1972). *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 23, 219-234.

91. WALLACE, W. (1974). *Biochim. Biophys. Acta*, 341, 265-276.
92. WARBURG, O., KRIPPAHL, G. y SCHRÖDER, W. (1954). *Z. Naturforsch.*, 39, 665-675.
93. WILDNER, G.L. y CRIDDLE, R.S. (1969). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 952-960.
94. WOOD, W.A. (1955), en "Methods in Enzymology", vol II, p. 214, editado por S.P. COLLOWICK y N.O. KAPLAN. Academic Press, New York.
95. ZALOKAR, M. (1955). *Arch. Biochem.*, 56, 318-325.
96. ZUMFT, W.G. (1970). Tesis Doctoral, Universidad de Erlangen-Nuremberg.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

D. Jose Manuel Roldan Noguera
titulada "Recativación por luz azul de la pigmentación reductora de algas verdes y plantas superiores"

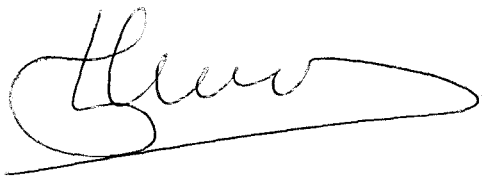
acordó otorgarle la calificación de sobresaliente
cum Laude

Sevilla, 2 de Octubre 1.976

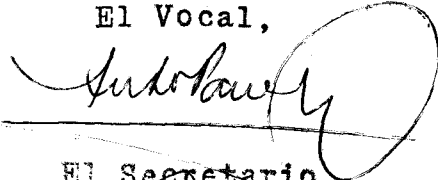
El Vocal,



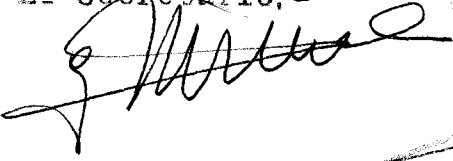
El Presidente,



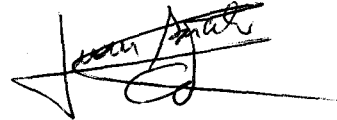
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal,



El Secretario,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672257