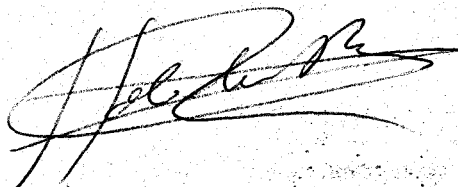


NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA: MECANISMO CINETICO Y EFECTOS
DE AGENTES DESNATURALIZANTES

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Ciencias
por el Licenciado Francisco Fernando de la Rosa Acosta



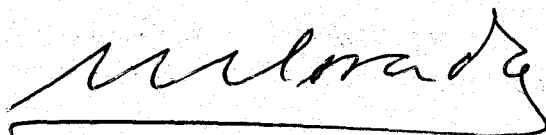
Sevilla, Noviembre de 1973

Director



Dr. Enrique Palacián Gil
Investigador del CSIC

Ponente



Prof. Manuel Losada Villasante
Catedrático de Bioquímica

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA CIENCIAS
8-11-75
ENTRADA N.º 657

TD

173



A mis padres

A Marí Lola

A mi hijo

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

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento al Profesor Manuel Losada Villasante y al Dr. Enrique Palacián Gil, quienes con su dedicación constante han hecho posible la realización de este trabajo.

Agradezco al Profesor Antonio Paneque Guerrero su colaboración y labor crítica.

Al Dr. Jacobo Cárdenas Torres, que me inició en las tareas investigadoras, mi sincero agradecimiento.

A los demás compañeros del Departamento y muy especialmente al Dr. C. Gómez-Moreno, F. Castillo y J.M. Mendez, les agradezco su eficaz ayuda.

Mi sincero reconocimiento a M^a Isabel Carretero y M^a José Pérez de León por su ayuda en la confección de este trabajo y a José Moreno por su asistencia técnica.

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

INDICE

Abreviaturas	9
I. <u>INTRODUCCION</u>	10
II. <u>MATERIALES Y METODOS</u>	26
1. OBTENCION DE NITRATO REDUCTASA	27
1.1. Material biológico	27
1.2. Preparación de la nitrato reductasa	27
2. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS ..	28
2.1. Actividad NADH-nitrato reductasa	28
2.2. Actividad FNH ₂ -nitrato reductasa	29
2.3. Actividad NADH-diaforasa	29
3. TECNICAS Y METODOS ANALITICOS	30
3.1. Centrifugación en gradiente de sacarosa	30
3.2. Determinación de proteína	30
4. REACTIVOS Y APARATOS'	30
4.1. Preparación del gel de fosfato cálcico	30
4.2. Preparación del citocromo <u>c</u> reducido	31
4.3. Procedencia de los productos químicos	31
4.4. Aparatos	32
III. RESULTADOS	33
1. PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINA- CA	34

2. CINÉTICA DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA ..	39
2.1. Efecto del pH sobre la velocidad máxima	39
2.2. Efecto de la temperatura sobre la velocidad má- xima	41
2.3. Cinética de la NADH-citocromo <u>c</u> reductasa en el estado estacionario	41
2.4. Cinética de la NADH-nitrato reductasa en el es- tado estacionario	50
3. ACCION DE LOS AGENTES DESNATURALIZANTES SOBRE LA NITRATO REDUCTASA	64
3.1. Efecto del pH	64
3.2. Efecto de la temperatura	72
3.3. Efecto de la urea	75
3.4. Efecto del dodecil sulfato sódico	83
3.5. Efecto del clorhidrato de guanidina	86
3.6. Estudios de hibridación	91
IV. DISCUSION	92
V. CONCLUSIONES	106
VI. BIBLIOGRAFIA	110

ABREVIATURAS

DTE	2,3-dihidroxi-1,4-ditiol butano (ditioeritritol)
EDTA	Acido etilendiaminotetracético (sal sódica)
FAD	Flavín-adenín-dinucleótido
FMN	Flavín-mononucleótido
FNH ₂	FAD o FMN reducidos
g	aceleración de la gravedad
NAD ⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato
NADPH	Nicotinamida-adenín-dinucleótido-fosfato reducido
NAD(P)H	NADH o NADPH indistintamente
NO ₃ Rasa	Nitrato reductasa
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
SDS	Dodecil sulfato sódico
Tris	Tri-(hidroximetil)-aminometano

I. INTRODUCCION

Con la excepción del carbono, del hidrógeno y del oxígeno, el nitrógeno es el elemento más abundante en los organismos vivos.

Aunque el nitrógeno molecular constituye el 80% de la atmósfera terrestre, es químicamente inerte y la mayor parte de los organismos no lo pueden utilizar. Sin embargo, algunos organismos están capacitados para la fijación del nitrógeno atmosférico, que pueden realizar: por fijación simbiótica como la que tiene lugar en las plantas leguminosas, o por fijación no simbiótica como llevan a cabo diversos microorganismos tales como las algas verde-azuladas y algunas especies de bacterias.

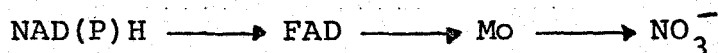
En el suelo existen algunas bacterias que consiguen energía oxidando amoníaco con formación de nitrito y finalmente nitrato. Dado que estos organismos son muy abundantes y activos, casi todo el amoníaco que llega al suelo procedente de la materia orgánica resulta finalmente oxidado a nitrato.

Por lo tanto, la mayor parte de los vegetales absorben el nitrógeno del suelo en forma de nitrato. Sin embar-

go, el nitrógeno en esta forma no puede ser directamente empleado por la planta, sino que debe ser reducido hasta amonio antes de que pueda ser incorporado en los compuestos nitrogenados del vegetal. En organismos fotosintéticos, esta reducción parece estar estrechamente relacionada con las reacciones fotosintéticas propiamente dichas y regulada a través de ellas (1,2,3). En bacterias y hongos, la reducción ocurre en la oscuridad a expensas de compuestos reductores de diversa composición y naturaleza (4,5,6).

La reducción metabólica del nitrato hasta el amonio transcurre en dos etapas: 1) reducción del nitrato a nitrito y 2) reducción del nitrito a amonio (7,8). La primera reacción, que tiene lugar con transferencia de dos electrones al nitrato, está catalizada por el complejo enzimático nitrato reductasa. La segunda reacción, que reduce el nitrito a amonio, con transferencia de seis electrones, está catalizada por la nitrito reductasa (9,12). Como producto final se forma amonio que es utilizado en la síntesis de los compuestos biológicos nitrogenados.

La nitrato reductasa es una flavoproteína que contiene molibdeno y utiliza piridín nucleótidos reducidos como donadores de electrones. El flujo electrónico hacia el nitrato transcurre según el esquema:



A excepción de la especificidad para los piridín nucleótidos, la NADH-nitrato reductasa de organismos fotosintéticos (11,18) parece ser muy similar a la NADPH-nitrato reductasa de levaduras y hongos (10,14).

La nitrato reductasa es un complejo enzimático de alto peso molecular con dos actividades parciales diferentes, las cuales participan secuencialmente en la transferencia de electrones desde el NAD(P)H hasta el nitrato. La primera actividad parcial es una NADH-diaforasa dependiente de FAD (19,21) que puede utilizar diversos aceptores de electrones, como citocromo c, vitamina K y 2,6-dicloro fenol-indofenol (22,23). La segunda actividad es la FNH₂-nitrato reductasa terminal, contiene molibdeno y puede utilizar flavín nucleótidos reducidos o viológenos reducidos como donadores de electrones (20,26).

Estudios a nivel celular y enzimático, que incluyen la utilización de tungsteno como inhibidor competitivo frente al molibdeno y el empleo de radioisótopos, han permitido concluir que en Chlorella (13,15,25,28) y en plantas superiores (16,17,24,27) el molibdeno es un componente esencial de la nitrato reductasa. También en hongos y bacterias se tienen pruebas de la participación del molibdeno en esta actividad enzimática (37,88).

Las actividades NADH-diaforasa y FNH_2 -nitrato reductasa se afectan de manera muy diferente por diversos tratamientos e inhibidores, y pueden protegerse específicamente contra estos efectos por la acción de sus propios sustratos y otros compuestos.

La NADH-diaforasa es especialmente sensible a la inactivación por los reactivos de grupos sulfhidrilo (11, 19,36,46). La pérdida de su actividad va acompañada de la inactivación de la NADH-nitrato reductasa. Estos resultados sugieren la existencia de grupos sulfhidrilo en la porción diaforásica del complejo relacionados con la actividad enzimática.

El NADH protege a la nitrato reductasa de Chlorella (11) y espinaca (35) y el FAD a la de espinaca (35), contra la inactivación por los citados reactivos.

La porción diaforásica también es sensible al tratamiento térmico. El calentamiento a 45°C durante cinco minutos del enzima de espinaca (26) y de algas (20), inactiva completamente la NADH-diaforasa, lo cual dá lugar a la pérdida de la capacidad de reducción del nitrato por NADH, sin afectar a la FNH_2 -nitrato reductasa. La inactivación de la NADH-diaforasa por el calor, puede evitarse si el tratamiento se efectúa en presencia de FAD (20).

La FNH_2 -nitrato reductasa se inhibe por algunos compuestos como cianuro, azida y carbamifosfato. Esta inhibición es de tipo competitivo respecto al nitrato (11,35).

La nitrato reductasa se encuentra regulada por dos mecanismos: por control de su síntesis, y por interconversión.

Se había propuesto repetidamente que el nitrato era inductor de la síntesis de la nitrato reductasa de algas y de plantas superiores (33,34). Sin embargo, resultados posteriores parecen indicar que es el amonio el que actúa como represor de todo el sistema reductor de nitrato (28, 38,43).

Junto a la represión de la síntesis de la nitrato reductasa, el amonio produce in vivo la inactivación reversible de dicho enzima. Al añadir amonio a un cultivo de las algas Chlorella o Chlamydomonas creciendo en la luz en presencia de CO_2 , la FNH₂-nitrato reductasa se inactiva rápidamente sin que se afecte la NADH-diaforasa. Este proceso es reversible y el enzima se reactiva al eliminar el amonio del medio de cultivo (2,3,39,51). El amonio actúa, al parecer, como desacoplante de la fosforilación fotosintética (40) aumentando el poder reductor y disminuyendo la carga energética celular. El enzima inactivado in vivo por amonio puede reactivarse in vitro por oxidación con ferricianuro (39).

El enzima activo se puede inactivar in vitro por incubación con piridín nucleótidos reducidos, pudiéndose

reactivar por oxidación con ferricianuro (42). La nitrato reductasa de Chlorella también se inactiva in vitro por tioles simples, como DTE y mercaptoetanol, y por sulfito; la reactivación se consigue también con ferricianuro (44, 49). Parece probable pues, que la inactivación sea debida a la reducción de puentes disulfuros.

En plantas superiores no se tienen pruebas directas de regulación in vivo de la nitrato reductasa por interconversión. Sin embargo, in vitro, se ha encontrado que los piridín nucleótidos reducidos, así como los tioles simples, inactivan la FNH_2 -nitrato reductasa de espinaca; consiguiéndose la reactivación con ferricianuro (45, 49, 52). Se puede pensar pues, en la existencia de una regulación in vivo de este enzima en plantas superiores semejante a la encontrada en algas (2, 3, 39).

Usando preparaciones de nitrato reductasa de espinaca, se encontró, que la inactivación por NADH de la FNH_2 -nitrato reductasa, parecía requerir un enzima con la porción diaforasa funcionalmente activa; ya que el calentamiento a 45°C durante 5 minutos en ausencia de FAD, inactiva la

porción diaforasa, pero no la FNH_2 -nitrato reductasa, y produce la pérdida de la capacidad de inactivación por NADH (45). La presencia de FAD $20 \mu\text{M}$ protege del calentamiento a la actividad NADH-diaforasa y a la capacidad de inactivación por NADH(45). Sin embargo, no existe proporcionalidad entre la actividad NADH-diaforasa y el grado de inactivación de la FNH_2 -nitrato reductasa por NAD(P)H, ya que el calentamiento en presencia de FAD no afecta a la porción diaforasa y sí produce un aumento del grado de inactivación por NAD(P)H (45).

El tratamiento con pHMB, a concentraciones entre 20 y 50 nmoles por mg de proteína, de la nitrato reductasa de espinaca, inactiva completamente la NADH-nitrato reductasa y la NADH-diaforasa, mientras que no afecta a la FNH_2 -nitrato reductasa (46). Concentraciones más altas de pHMB también inactivan a la FNH_2 -nitrato reductasa (46). Preparaciones con actividad FNH_2 -nitrato reductasa, pero desprovistas de diaforasa por tratamiento con pHMB, se inactivan por NADH de la misma forma que las preparaciones nativas (46, 47), lo cual indica que la inactivación por NADH no requiere una diaforasa funcional.

Así mismo, se ha comprobado, que el tratamiento por pHMB de la nitrato reductasa de espinaca, a la vez que causa la desaparición de la NADH-diaforasa, hace aparecer un requerimiento de FAD para la inactivación por NAD(P)H de la FNH₂-nitrato reductasa (48). Sin embargo, la actividad diaforasa de la preparación tratada, no se afecta por incubación con FAD o la adición de este nucleótido a la mezcla de ensayo (48). Por otra parte, la filtración de una preparación nativa a través de Sepharosa 6B produce la aparición de una estimulación por FAD de la diaforasa, pero el FAD no afecta a la inactivación por NADH (48).

Estos diferentes requerimientos de FAD para la NADH-diaforasa y para la inactivación por NADH, así como la inactivación por NADH de una preparación carente de diaforasa, hacen pensar que estos dos procesos son en cierto modo independientes, y apoyan la postulada existencia (45,47,48) de un sitio de unión para los piridín nucleótidos reducidos responsables de la inactivación y diferente del sitio catalítico.

En este trabajo se ha estudiado la posible relación entre la inactivación por NAD(P)H y la actividad NADH-diaforasa. Se ha analizado, en preparaciones tratadas con diversos agentes desnaturalizantes, las distintas actividades del complejo enzimático y la capacidad de inactivación por NADH, confirmándose la posibilidad de inactivación por NADH de preparaciones desprovistas de actividad NADH-diaforasa.

Son escasos los estudios realizados sobre el mecanismo cinético de la nitrato reductasa. Eaglesham et al., (76) han propuesto un mecanismo cinético para la nitrato reductasa de espinaca del tipo Ping Pong Bi Bi.

Cleland (70) define dos tipos básicos de mecanismos cinéticos para las reacciones enzimáticas: el mecanismo Secuencial y el Ping Pong. La diferencia entre uno y otro radica en el orden en que se unen los sustratos y productos al enzima. En el mecanismo Secuencial todos los sustratos se unen al enzima antes de que se libere ningún

producto, mientras que en el mecanismo Ping Pong uno o más productos se liberan antes de que se llegue a unir todos los sustratos al enzima.

El estudio de las velocidades iniciales, permite determinar el tipo de mecanismo básico, utilizando la representación de Lineweaver-Burk de las velocidades iniciales a concentraciones variables de los sustratos. El mecanismo Ping Pong da lugar a una distribución de rectas paralelas, mientras que el secuencial presenta una distribución de rectas con distintas pendientes (69,70,72,74).

Eaglesham et al., (76) se han basado en el estudio de las velocidades iniciales para concluir que el mecanismo enzimático de la nitrato reductasa es del tipo Ping Pong Bi Bi. Sin embargo, para determinar más exactamente el mecanismo cinético de una reacción enzimática, es necesario, además del estudio de las velocidades iniciales, conocer con detalle los tipos de inhibiciones a que dan lugar los compuestos que intervienen en la reacción (sustratos y productos) (71,73,75). Así mismo, cualquier compuesto que se comporte como inhibidor de la reacción puede dar información sobre el mecanismo cinético (68).

En este trabajo se ha estudiado el mecanismo cinético del complejo nitrato reductasa, analizando, las velocidades iniciales en el estado estacionario y los tipos de inhibición por producto a que dan lugar los diferentes compuestos liberados en la reacción. Este estudio se ha efectuado tanto para la actividad NADH-nitrato reductasa, como para la NADH-citocromo c reductasa.

Los pesos moleculares de nitrato reductasa, procedentes de diversos organismos -500.000 daltons, algas y espinaca (32,50); 230.000, Neurospora crassa (37); y 160.000, maiz (18)- sugieren que el complejo enzimático está formado por varias subunidades, pudiendo presentarse en distintos estados de agregación. Los conocimientos sobre la estructura cuaternaria de la nitrato reductasa son escasos. Sólomente a partir de bacterias (29,30) y hongos (37,41) se han obtenido preparaciones homogéneas del enzima, necesarias para un estudio detallado.

Nason et al., (53,54,55) han logrado reconstruir un complejo enzimático, con actividad NADPH-nitrato reductasa, por complementación in vitro entre dos preparaciones de

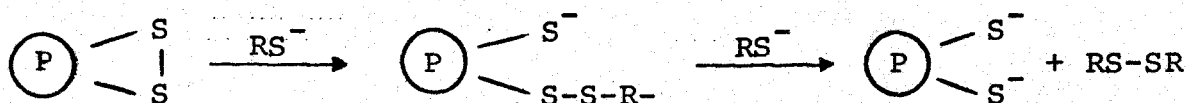
nitrato reductasa procedentes de mutantes de Neurospora crassa. Una de las preparaciones carecía de actividad diaforásica y la otra de FNH_2 -nittrato reductasa. Estos resultados indican que el complejo de N. crassa consta al menos de dos subunidades diferentes, a cada una de las cuales corresponde una de las actividades enzimáticas parciales.

- - - - -

Los métodos descritos para la purificación de nitrato reductasa de algas y plantas superiores (20,31), permiten obtener preparaciones parcialmente purificadas con actividades específicas alrededor de 0,6 unidades internacionales. Además, estos procedimientos de purificación constan de gran número de operaciones. En este trabajo, se presenta un procedimiento de purificación sencillo para el enzima de espinaca, con el cual, pueden obtenerse preparaciones con una actividad específica mayor que las anteriormente descritas. La relación entre las actividades NADH-nitrato reductasa y FNH_2 -nittrato reductasa en las distintas etapas de purificación, ha sido utilizada como criterio de integridad del complejo.

Los agentes desnaturizantes actúan sobre las proteínas globulares cambiando la estructura tridimensional nativa, al destruir, las estructuras terciaria y secundaria parcial o totalmente sin afectar a los enlaces covalentes. Los tratamientos suaves pueden producir la disociación en subunidades, sin que se afecten notablemente las estructuras secundaria y terciaria, especialmente en el caso de moléculas oligoméricas. Es común el uso de tioles, junto con los agentes desnaturizantes, para reducir los puentes disulfuro que puedan existir entre subunidades diferentes o bien dentro de una misma subunidad (56-60,64).

Los tioles son reactivos específicos para la reducción y ruptura de los puentes disulfuro de las proteínas (61). La reacción tiene lugar según el siguiente esquema:



Con monotioles la constante de equilibrio es aproximadamente la unidad, por lo que se requiere un gran exceso de tiol para obtener la reducción completa de los puentes

disulfuro. Con ditiolos que forman un anillo estable en el estado oxidado (por ejemplo el DTE), el equilibrio se desplaza hacia la derecha, siendo menor la concentración necesaria para obtener una reducción completa (62, 63).

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto sobre las actividades del complejo nitrato reductasa y la capacidad de inactivación por NADH, de ciertos agentes desnaturizantes: pH ácido y básico, calor, urea, dodecil sulfato sódico y clorhidrato de guanidina. En algunos casos se han efectuado los tratamientos en presencia de DTE. El FAD protegió de la inactivación en muchos casos, lo cual, indica su importancia en la estabilización de la estructura del complejo.

II. MATERIALES Y METODOS

1. OBTENCION DE NITRATO REDUCTASA

1.1. Material biológico

El material biológico consistió en hojas de espinaca (*Spinacea oleracea* L.) cultivadas en Gelves (Sevilla). A las hojas recolectadas se les quitaron los nervios y se lavaron varias veces, el último lavado con agua destilada. Las hojas así obtenidas se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a -20° C para su posterior utilización. Las hojas congeladas conservan las actividades del complejo nitrato reductasa durante varios meses.

1.2. Preparación de la nitrato reductasa

El proceso de purificación de las preparaciones enzimáticas se describe en RESULTADOS. Todos los experimentos de este trabajo están realizados con la Fracción III.

A 4° C, las preparaciones enzimáticas purificadas conservan las actividades del complejo durante más de una semana.

Para equilibrar las preparaciones con la solución requerida se pasaron a través de una columna de Sephadex G-25.

2. DETERMINACION DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

2.1. Actividad NADH-nitrato reductasa

Esta actividad se determinó de dos formas distintas: midiendo la desaparición de NADH espectrofotométricamente, o midiendo la cantidad de nitrito formado al cabo de un cierto tiempo (18).

En el primer método, la mezcla de reacción contenía además de la preparación enzimática, 100 mM de Tris-ClH (pH 7,5), 0,15 mM de NADH y 10 mM de NO_3K . La desaparición de NADH se siguió espectrofotométricamente a 340 nm.

En el segundo método, la mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml, 100 mM de Tris-ClH (pH 7,5), 10 mM de NO_3K , 0,3 mM de NADH y el enzima. La mezcla se incubó a 30° C durante 10 minutos, y la reacción se detuvo por adición de 1 ml de reactivo sulfanilamida seguido por

1 ml de N-(1-naftil)-etilendiamina. Se esperó al desarrollo del color durante 10 minutos y se midió a 540 nm.

2.2. Actividad FMN₂-nitrato reductasa

Se determinó, como la NADH-nitrato reductasa, midiendo el nitrito formado, pero usando como donador de electrones 0,2 mM de FMN reducido con S₂O₄Na₂ (8 mg de S₂O₄Na₂ en 1 ml conteniendo 8 mg de CO₃HNa) (31). La reacción se detuvo por agitación vigorosa hasta la aparición del color amarillo del FMN oxidado.

2.3. Actividad NADH-diaforasa

Se determinó espectrofotométricamente midiendo la reducción de citocromo c a 550 nm. La mezcla de reacción contenía: 100 mM de Tris-ClH (pH 7,5), 0,15 mM de NADH, 0,6 mM de citocromo c y la preparación enzimática (87).

La unidad de actividad enzimática se definió para las tres actividades como : micromoles de sustrato (NADH) desaparecido -o micromoles de producto (nitrito) formado- por minuto a 30°C.

3. TECNICAS Y METODOS ANALITICOS

3.1. Centrifugación en gradiente de sacarosa

Los gradientes se construyeron con un mezclador diseñado por BUCHLER, New Jersey (USA). Para obtener las fracciones de los tubos se utilizó un "Densi-flow" diseñado también por BUCHLER.

La centrifugación se realizó en un rotor de receptáculos basculantes S.W. 50L, en una centrífuga preparativa BECKMAN SPINCO L2-50B.

3.2. Determinación de proteína

Se siguió el método de Lowry et al. (65) utilizando ovoalbúmina como proteína patrón. En las preparaciones que contenían amónico se siguió el método de Warburg y Christian (66).

4. REACTIVOS Y APARATOS

4.1. Preparación del gel de fosfato cálcico

A 150 ml de una solución de cloruro cálcico (88,6 g de $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por litro) se añadió 160 ml de agua destilada. A continuación se añadió agitando, 150 ml de solución 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 varias veces con agua destilada y se resuspendió en una cantidad de agua suficiente para alcanzar una concentración de 10 mg/ml. Para valorar esta solución se desecó una alícuota en una estufa a 100°C y se pesó el residuo seco.

4.2. Preparación del citocromo c reducido

El citocromo c reducido se obtuvo por reducción con $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$ del citocromo c oxidado comercial. El exceso de reactivo se eliminó por filtración en Sephadex G-25, y la valoración del citocromo c reducido se hizo espectrofotométricamente a 550 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%} = 23$).

4.3. Procedencia de los productos químicos

Los productos NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH , FMN, FAD, citocromo c, anhídrido succínico y clorhidrato de guanidina se obtuvieron de SIGMA, St. Louis, U.S.A.; el DTE de

SERVA, Heidelberg, Alemania; el sulfato amónico, nitrato potásico, nitrito potásico, dodecil sulfato sódico y urea de MERCK, Darmstadt, Alemania; el azul dextrano y el Sephadex de PHARMACIA, Uppsala, Suecia. El resto de los productos eran de grado analítico.

El agua utilizada para la preparación de soluciones, estaba desionizada por cambio iónico en un desmineralizador SETA tipo R-100.

4.4. Aparatos

Las medidas de densidad óptica se realizaron en los espectrofotómetros BECKMAN DK-2A y PYE UNICAM 1.800, y en los fotocolorímetros BAUSCH & LOMB modelos SPECTRONIC 20 y SPECTRONIC 700.

Para las cromatografías en columnas se utilizaron columnas fabricadas por PHARMACIA. Para recoger las fracciones se usó un colector LKB modelo ULTRORAC 7.000.

Las medidas de pH se hicieron con un medidor de pH METHROM modelo E 512.

Las centrífugas usadas fueron SORVALL RC-2B refrigerada y BECKMAN SPINCO L2-50B.

III. RESULTADOS

1. PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA

El procedimiento de purificación (esquemmatizado en la Tabla I) se detalla a continuación. Todas las operaciones se realizan a una temperatura entre 0 y 5° C.

a) Obtención del homogenado

Las hojas de espinaca (1 kg) preparadas según se indica en Materiales y Métodos, se trituran en un OMNI-MIXER 17.220 con 1 litro de la solución tampón de fosfato potásico 0,01 M (pH 7,5), NO_3K 10 mM, EDTA 1 mM y FAD 20 μM . La mezcla se filtra por cuatro capas de g_{as}as y se centrifuga a 27.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante así obtenido constituye la Fracción I.

b) Precipitación con sulfato amónico entre el 25 y 45%

Al sobrenadante anterior se le añade poco a poco, mientras se agita, sulfato amónico en polvo hasta obtener una concentración del 25% de saturación. El pH se mantiene a 7,5 por adición de NH_4OH 2 N. Se deja reposar 15 minutos y se centrifuga a 27.000 x g durante 10 minutos. El precipitado se desecha y al sobrenadante se le

añade sulfato amónico en las mismas condiciones anteriores, hasta obtener una concentración del 45% de saturación. Se deja reposar 15 minutos y se vuelve a centrifugar a 27.000 x g durante 10 minutos. Se recoge el sedimento que se disuelve en 300 ml de Tris-ClH 10 mM (pH 7,5) y constituye la Fracción II.

c) Precipitación con gel de fosfato cálcico

A la solución obtenida en la etapa anterior se le añade gel de fosfato cálcico de una concentración de 10 mg/ml, hasta alcanzar la relación de 1 mg de gel por 25 mg de proteína. A continuación, se deja reposar 20 minutos y se centrifuga a 5.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se desecha, y el precipitado se suspende en 20 ml de solución fosfato potásico 0,05 M (pH 7,5) y se centrifuga a continuación a 5.000 x g durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante, y el precipitado se re-suspende en 40 ml de solución fosfato potásico 0,2 M (pH 7,5), NO_3K 10 mM, EDTA 1 mM y FAD 20 μM y se centrifuga a 27.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante así obtenido constituye la Fracción III.

d) Precipitación con sulfato amónico entre el 30 y el 40%

Al sobrenadante anterior se le añade poco a poco, mientras se agita, una solución de sulfato amónico saturada hasta obtener una concentración del 30% de saturación. El pH se mantiene a 7,5 por adición de NH_4OH 2 N. Se deja reposar 20 minutos y se centrifuga a $27.000 \times g$ durante 10 minutos. Se recoge el sobrenadante y con éste se repite la operación anterior, aumentando la concentración de sulfato amónico hasta el 40% de saturación. El precipitado recogido se resuspende en 5 ml de solución de fosfato potásico 0,2 M (pH 7,5), NO_3K 10 mM, EDTA 1 mM y FAD 20 μM , constituyendo la Fracción IV.

e) Cromatografía en columna de agarosa

La fracción anterior se hace pasar por una columna de agarosa -2,5 cm de diámetro y 60 cm de altura- equilibrada con fosfato potásico 0,2 M (pH 7,5), NO_3K 10 mM, EDTA 1 mM y FAD 20 μM . La elución de la columna se hace con esta misma solución. Se recolectan fracciones de 5 ml y se mezclan aquellas que presentan mayor actividad de nitrato reductasa, constituyendo la Fracción V.

Tabla I

PURIFICACION DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA

Fracción	1 Proteína total (mg)	2 Activ. total de NADH-NO ₃ Rasa (unidades)	3 Recuperación de actividad (%)	4 Activ. específica de NADH-NO ₃ Rasa (miliunidades/mg)	5 $\frac{\text{NADH-NO}_3 \text{ Rasa}}{\text{FMNH}_2\text{-NO}_3 \text{ Rasa}}$
I. Homogenado	20.000	130	100	6,5	1,2
II. Precipitado con sulfato amónico (25% - 45%)	11.000	90	70	8,2	0,8
III. Precipitado con gel de fosfato (1mg/25mg proteína)	166	50	38	300	0,8
IV. Precipitado con sulfato amónico (30% - 40%)	22	22	16,9	1.000	0,73
V. Eluato de la columna de agarosa	1,5	4	3	2.600	0,73

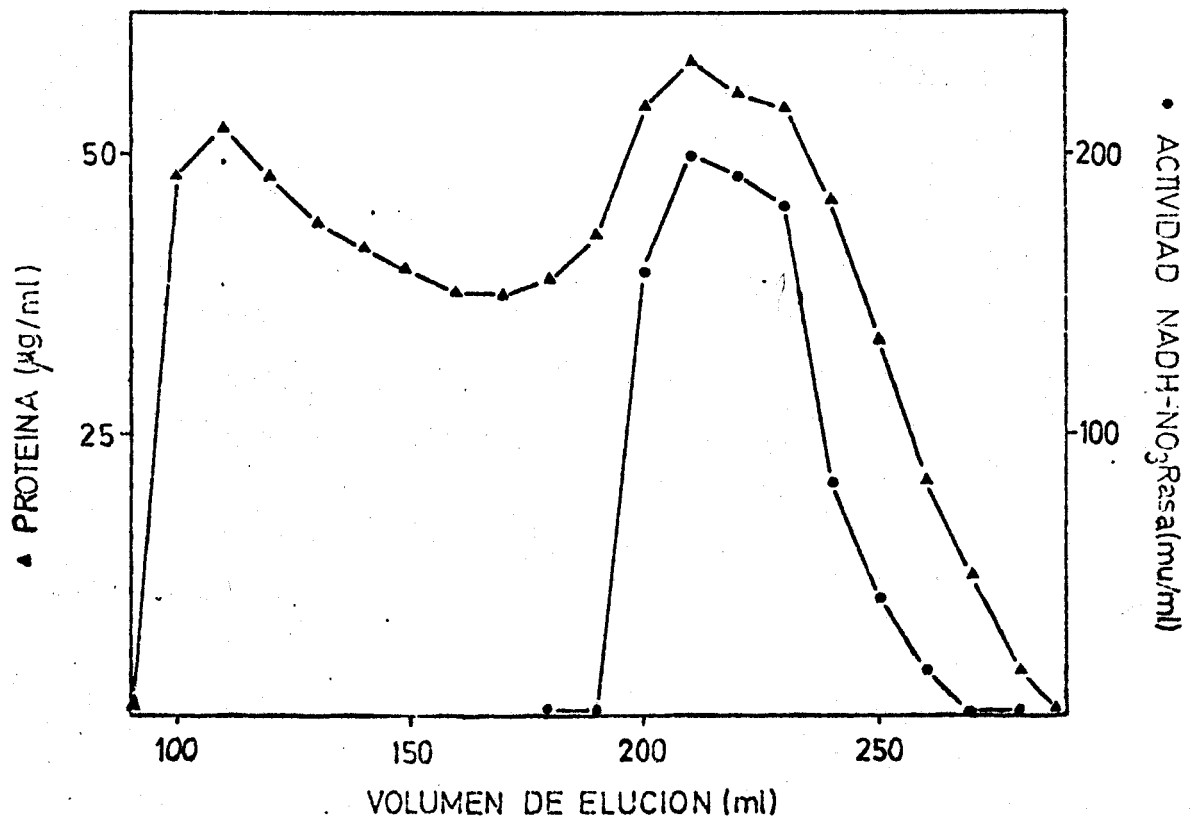


Figura 1.-Cromatografía en columna de agarosa de la FracciónIV.

2. CINÉTICA DE LA NITRATO REDUCTASA DE ESPINACA

2.1. Efecto del pH sobre la velocidad máxima

El pH en una reacción enzimática puede afectar la K_m para el sustrato y la velocidad máxima. El efecto sobre la afinidad del enzima por el sustrato puede eliminarse por concentración saturante de éste, y es entonces cuando puede establecerse el efecto del pH sobre la velocidad máxima. El efecto del pH sobre la velocidad máxima está influenciado solamente por el estado iónico del complejo enzima sustrato y es independiente de los estados iónicos del enzima libre o sustrato (67).

En la Fig. 2 se representan las velocidades máximas para las tres actividades del complejo nitrato reductasa en función del pH. En ella puede apreciarse un pH óptimo de 7,5 para las tres actividades. A ambos lados del pH óptimo la velocidad máxima para las tres actividades disminuye, siendo la NADH-nitrato reductasa la que experimenta una caída mayor y la NADH-diaforasa la que menos se afecta por el cambio de pH.

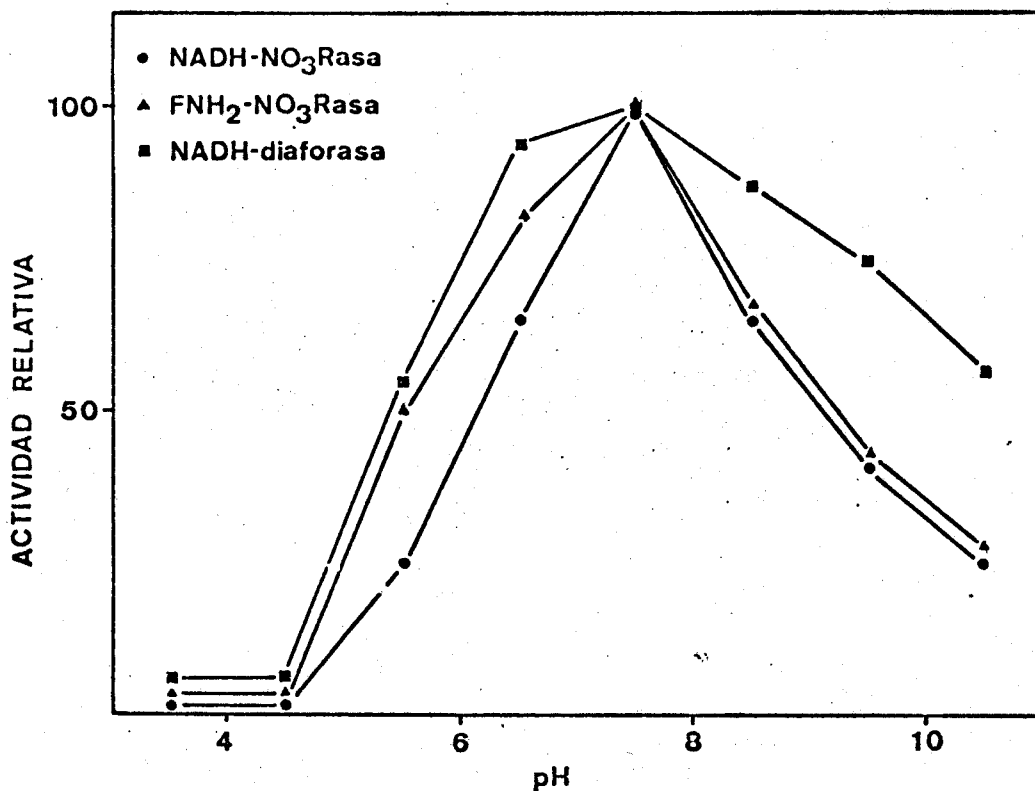


Figura 2.-Variación de las actividades de la nitrato reductasa con el pH.

Los pHs indicados se obtuvieron en la mezcla de ensayo utilizando las siguientes soluciones tampón: citrato-fosfato 0,05M, para pHs 3,5 4,5 5,5 6,5; fosfato 0,05M para pH 7,5; tris-ClH 0,2M para pH 8,5; carbonato-bicarbonato 0,2M para pHs 9,5 10,5. Además de los otros componentes de la mezcla de ensayo que se indican en "Materiales y métodos", se incluyeron FAD 20 μ M y EDTA 1mM. Las actividades NADH-diaforasa y NADH-NO₃Rasa se determinaron espectrofotométricamente; la FNH₂-NO₃Rasa se determinó midiendo la aparición de nitrito al cabo de 3 minutos de incubación de la mezcla de ensayo.

Las actividades se expresan como porcentajes de las correspondientes a pH 7,5.

2.2. Efecto de la temperatura sobre la velocidad máxima

En la Fig. 3 se muestra como afecta la temperatura a las actividades NADH-nitrato reductasa y FNH_2 -nitrato reductasa. En la representación de Arrhenius, las pendientes de las rectas correspondientes a las dos actividades son iguales, lo que indica un mismo valor para la energía de activación (10,98 Kcal/mol) (67).

2.3. Cinética de la NADH-citocromo c reductasa en el estado estacionario

2.3.1. Velocidades iniciales

El estudio de las velocidades iniciales se hicieron variando la concentración de uno de los sustratos para diferentes concentraciones fijas del otro. En las Fig. 4 y 5 se representan los inversos de las velocidades frente a los inversos de las concentraciones de sustrato variable, para varias concentraciones de sustrato fijo. Como se puede observar, en las dos representaciones existe una distribución de rectas paralelas (68).

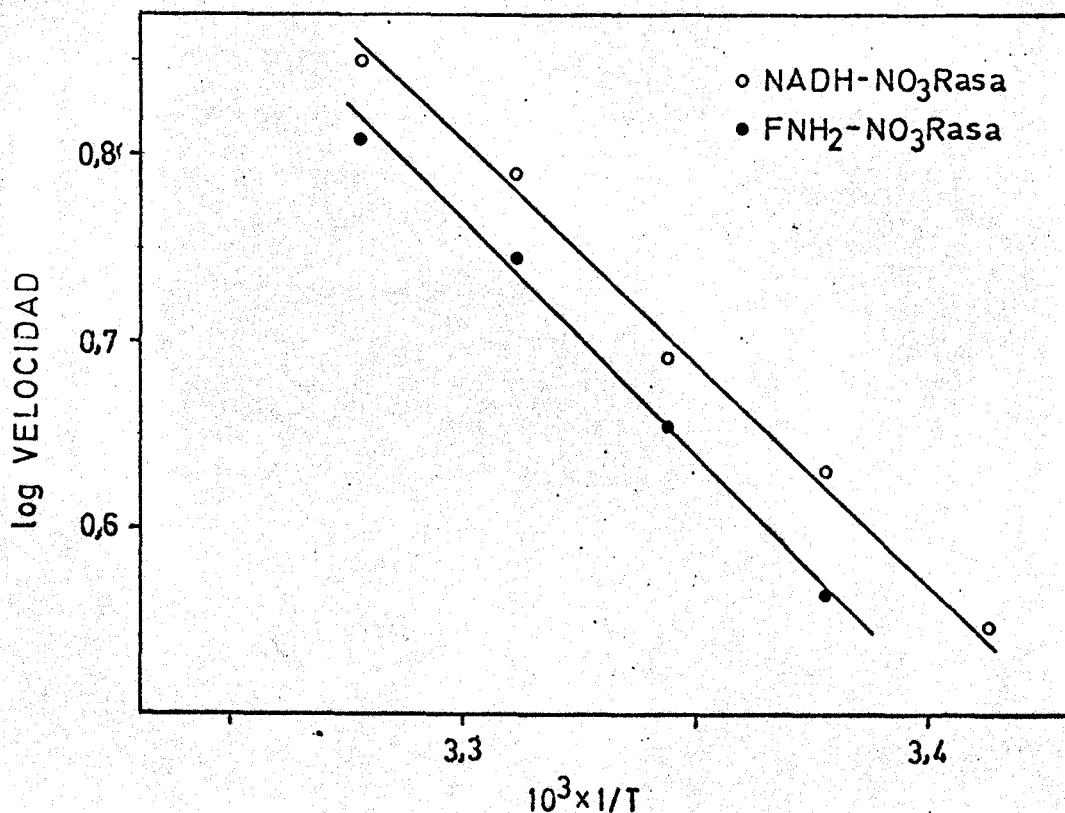


Figura 3. Representación de Arrhenius para las actividades NADH-nitrato reductasa y FNH₂-nitrato reductasa. Las actividades enzimáticas se ensayaron por el método colorimétrico midiendo la cantidad de nitrito formado al cabo de 5 minutos de incubación a 30°C.

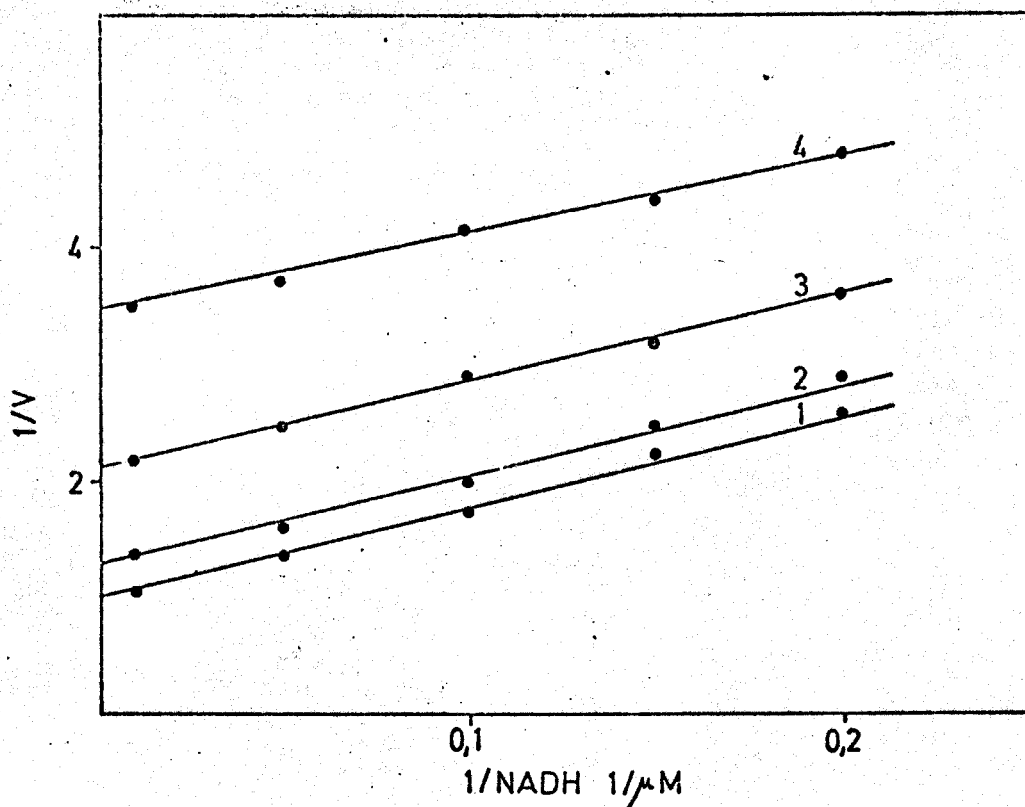


Figura 4. Velocidades iniciales de la actividad NADH-citocromo c reductasa a concentración de NADH variable. Las concentraciones de citocromo c oxidado fueron: 1, 50 μM; 2, 25 μM; 3, 10 μM; 4, 5 μM.

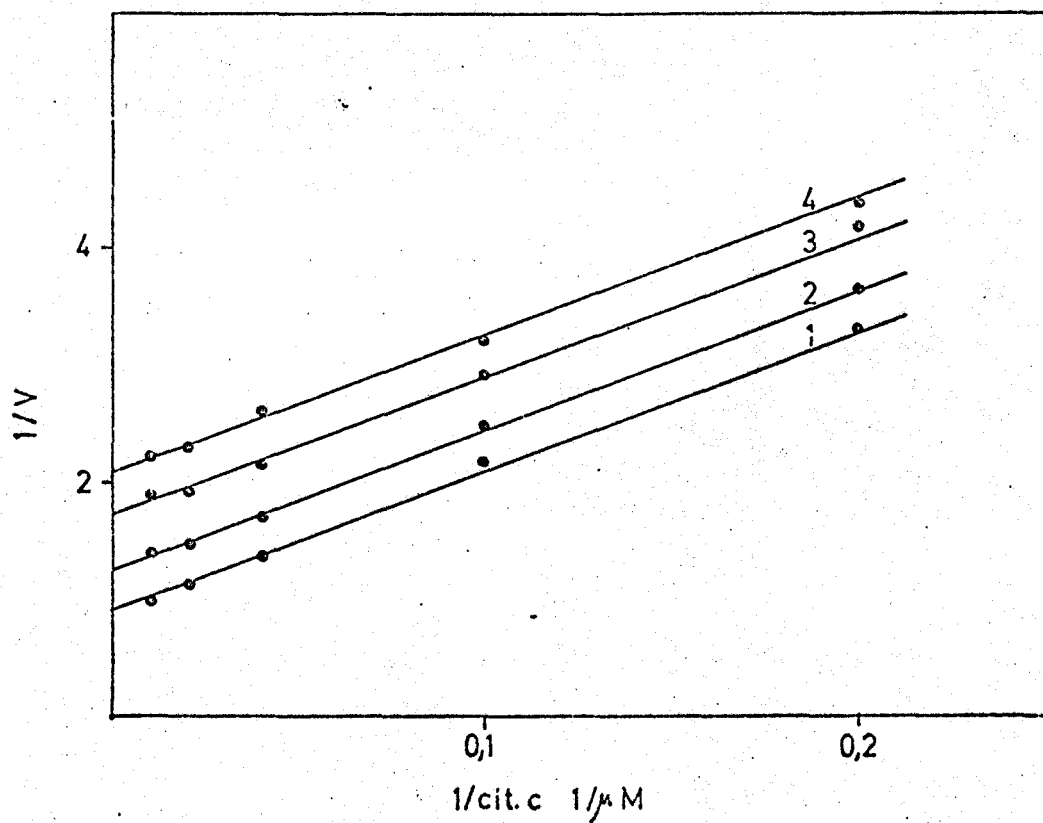


Figura 5. Velocidades iniciales de la actividad NADH-citocromo c reductasa a concentración de citocromo c oxidado variable.

Las concentraciones de NADH fueron: 1, 100 μM ; 2, 20 μM ; 3, 10 μM ; 4, 6,66 μM .

De acuerdo con Cleland (68,70,72), una distribución de rectas paralelas, semejantes a las anteriores, indica la existencia de un mecanismo enzimático de tipo Ping Pong. La ecuación a la que se ajusta dicho mecanismo en función de constantes medibles es:

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

donde v es la velocidad inicial, A y B son las concentraciones de los sustratos y K_a , K_b y V son constantes.

Las constantes K_a , K_b y V se pueden calcular a partir de las representaciones secundarias (Fig. 6 y 7), donde se representan las intersecciones obtenidas en las representaciones anteriores (Fig. 4 y 5) frente al inverso de la concentración de sustrato fijo, según las ecuaciones:

$$I_a = \frac{K_a}{V} \cdot \frac{1}{A} \cdot \frac{1}{V}$$

$$I_b = \frac{K_b}{V} \cdot \frac{1}{B} \cdot \frac{1}{V}$$

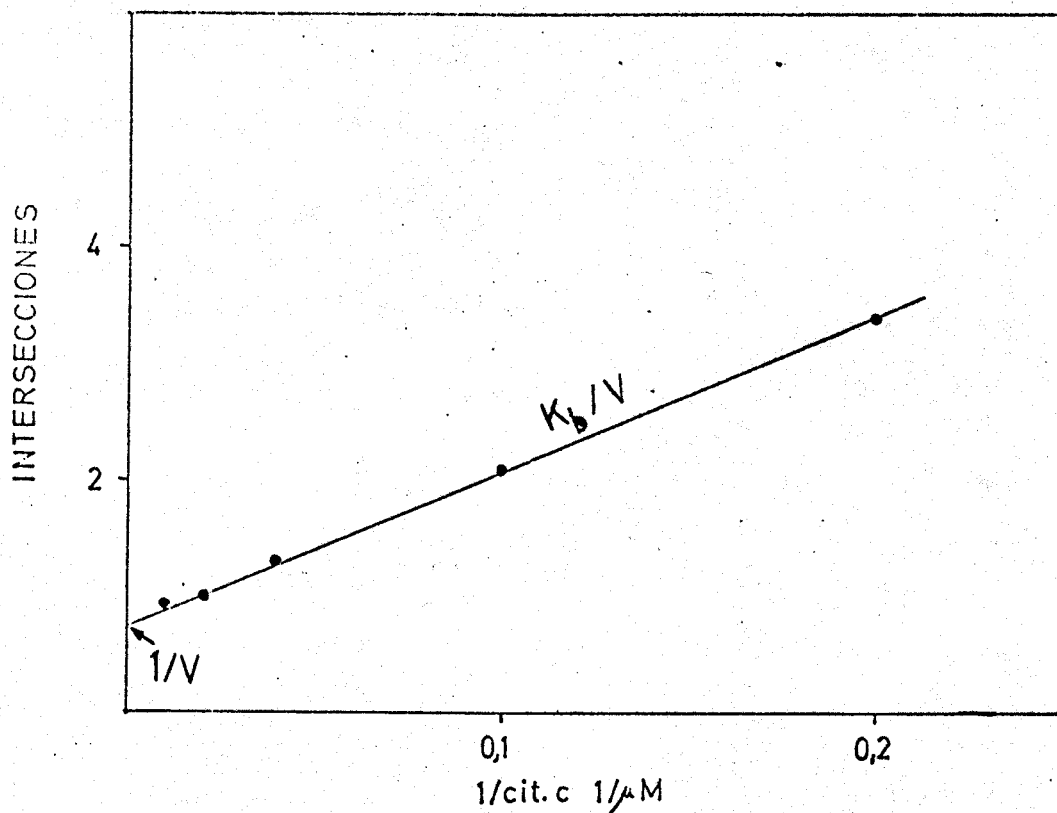


Figura 6. Representación de las intersecciones de la Fig. 4 con respecto a 1/citocromo c oxidado.

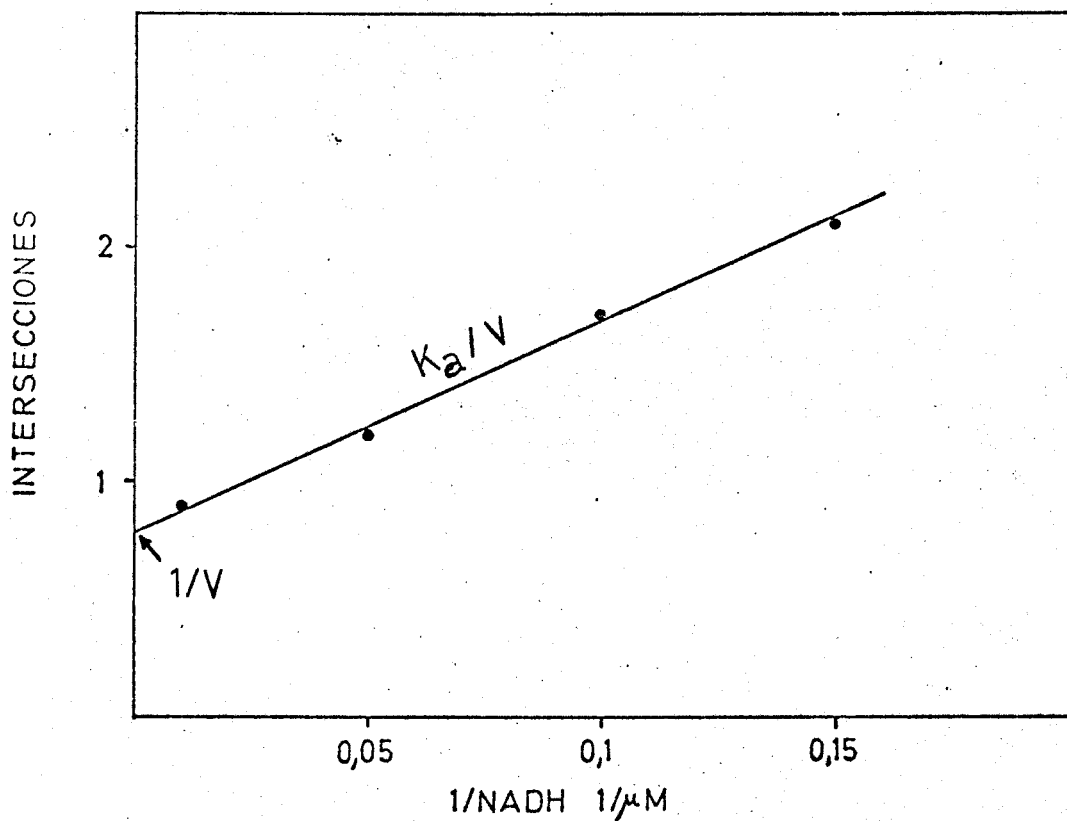


Figura 7. Representación de las intersecciones de la Fig. 5 con respecto a $1/\text{NADH}$.

Los valores obtenidos para K_a y K_b en las representaciones anteriores son: para K_a $11,2 \mu\text{M}$ (siendo el NADH el sustrato A) y para K_b $18,3 \mu\text{M}$ (con citocromo c oxidado como sustrato B).

2.3.2. Inhibición por producto

Los productos son sustratos de la reacción inversa, consecuentemente el efecto de los productos es siempre el de inhibir la reacción estudiada. El tipo de inhibición depende de cual de los sustratos es el variable y cual de los productos es el inhibidor. Un estudio completo de inhibición por producto abarca el uso de cada producto como inhibidor frente a cada sustrato como sustrato variable. Para un determinado mecanismo cinético puede predecirse el tipo de cada una de las inhibiciones por producto (71,73,74,75).

El efecto de cada uno de los productos se ha estudiado frente a cada uno de los sustratos. El citocromo c reducido frente a NADH como sustrato variable, muestra una distribución de rectas con distintas pendientes e intersecciones (Fig. 8), características de una inhibición no compe-

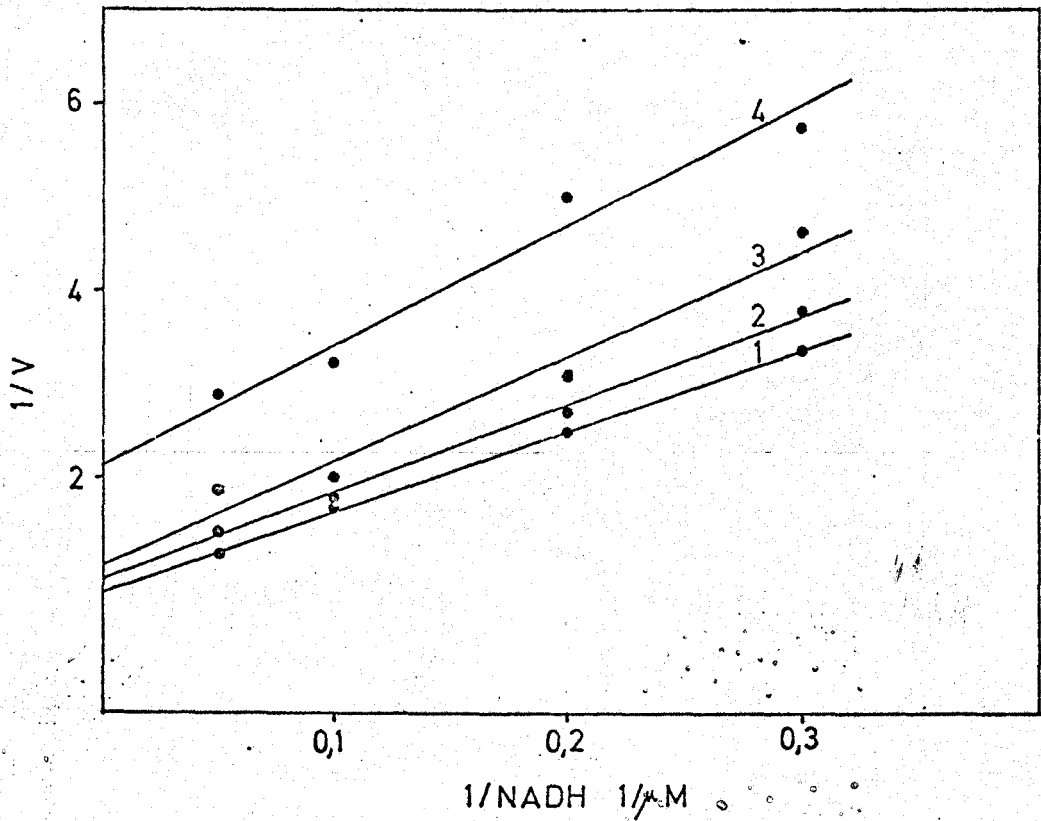


Figura 8. Inhibición por citocromo c reducido frente a NADH como sustrato variable.

La concentración de citocromo c oxidado fue 15 μM , y las de citocromo c reducido: 1, nada; 2, 50 μM ; 3, 75 μM ; 4, 100 μM .

titiva. La misma distribución de rectas se encontró para el citocromo c reducido frente al oxidado como sustrato variable (Fig. 9).

El NAD^+ frente a citocromo c oxidado como sustrato variable da una distribución de rectas que tienen distintas pendientes y la misma intersección (Fig. 10), características de una inhibición competitiva.

Por otra parte, el NAD^+ frente al NADH como sustrato variable, produce una inhibición que puede ser competitiva o no competitiva, dependiendo de la concentración del sustrato fijo citocromo c oxidado. Si la concentración es saturante ($100 \mu\text{M}$) la inhibición es competitiva (Fig. 11), si la concentración es no saturante ($10 \mu\text{M}$) la inhibición es no competitiva (Fig. 12).

2.4. Cinética de la NADH-nitrato reductasa en el estado estacionario

2.4.1. Velocidades iniciales

En las Fig. 13 y 14 se representan los inversos de las velocidades iniciales frente a los inversos de las concen -

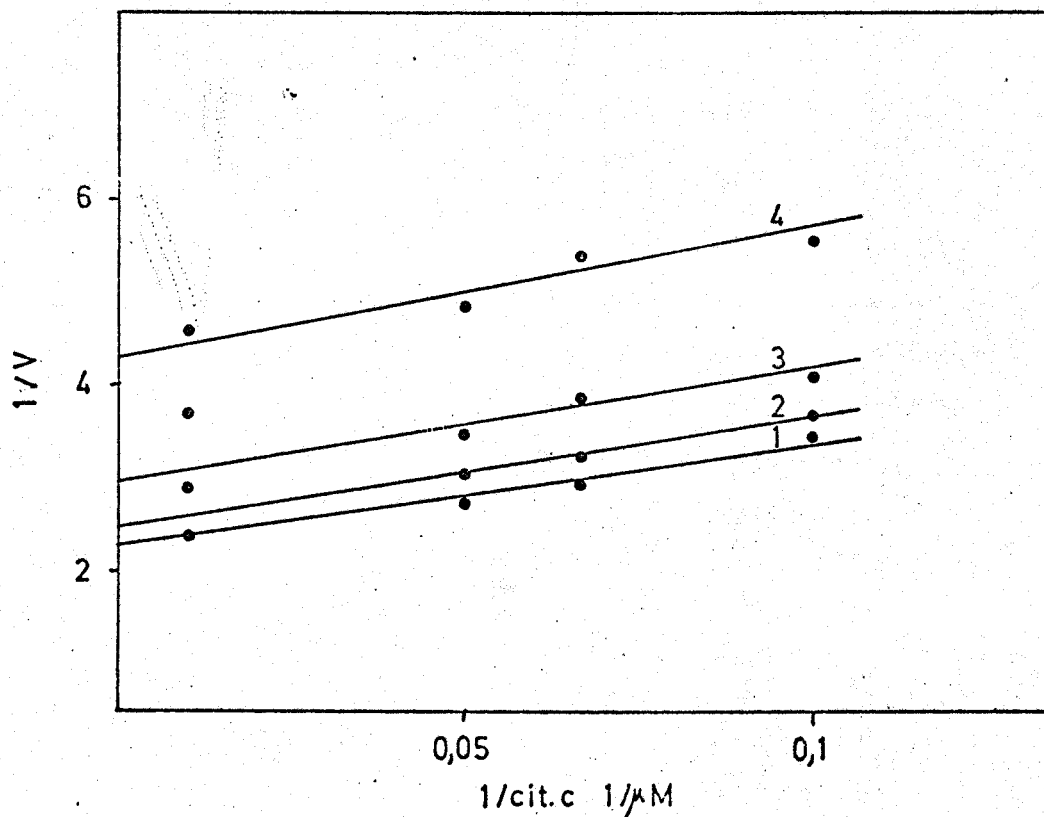


Figura 9. Inhibición por citocromo c reducido frente a citocromo c oxidado como sustrato variable. La concentración de NADH fue $15 \mu\text{M}$, y las de citocromo c reducido: 1, nada; 2, $0,5 \text{ mM}$; 3, $0,75 \text{ mM}$; 4, 1 mM .

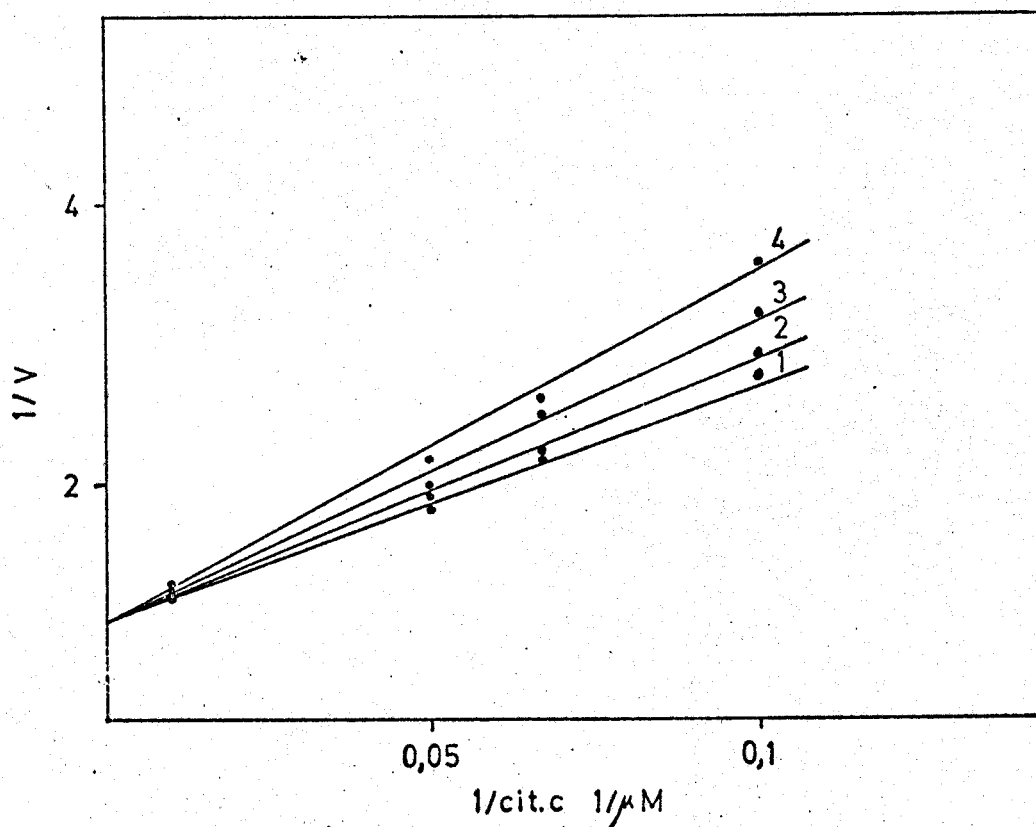


Figura 10. Inhibición por NAD^+ frente a citocromo c oxidado como sustrato variable.

La concentración de NADH fue $100 \mu\text{M}$, y las de NAD^+ : 1, nada; 2, $0,5 \text{ mM}$; 3, 1 mM ; 4, 2 mM .

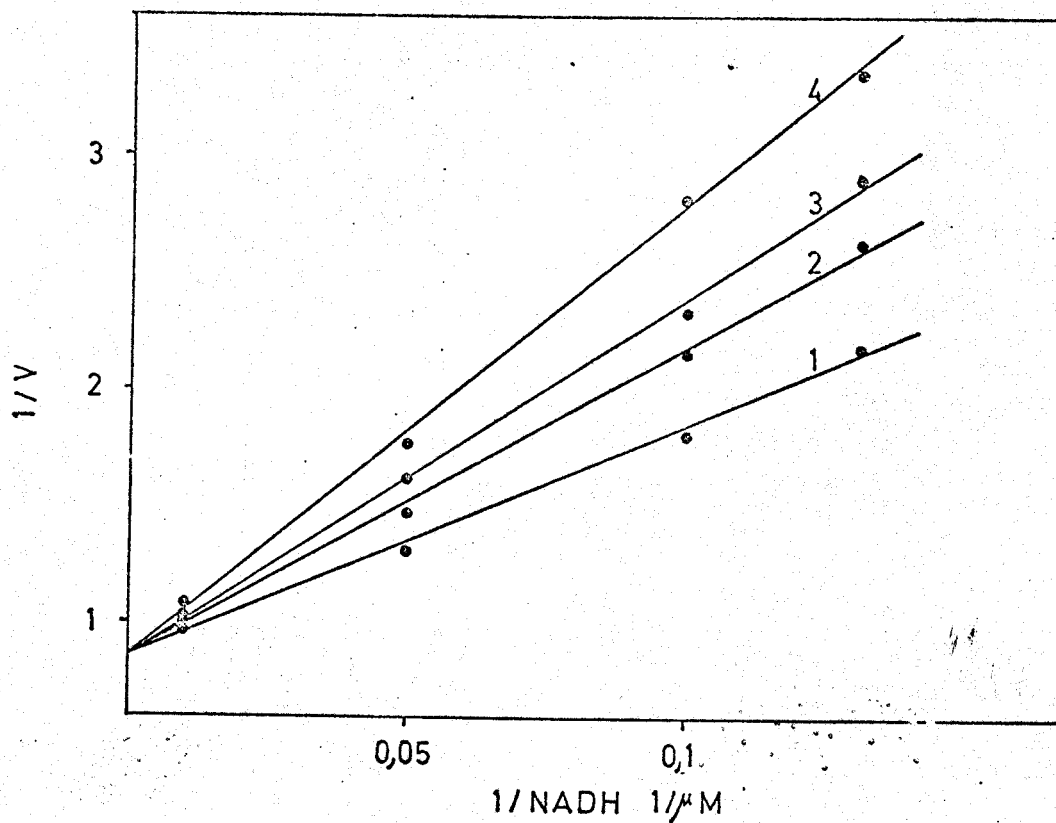


Figura 11. Inhibición por NAD^+ frente a $NADH$ como sustrato variable.

La concentración de citocromo c oxidado fue $100 \mu M$, y las de NAD^+ : 1, nada; 2, $0,5 \text{ mM}$; 3, 1 mM ; 4, 2 mM .

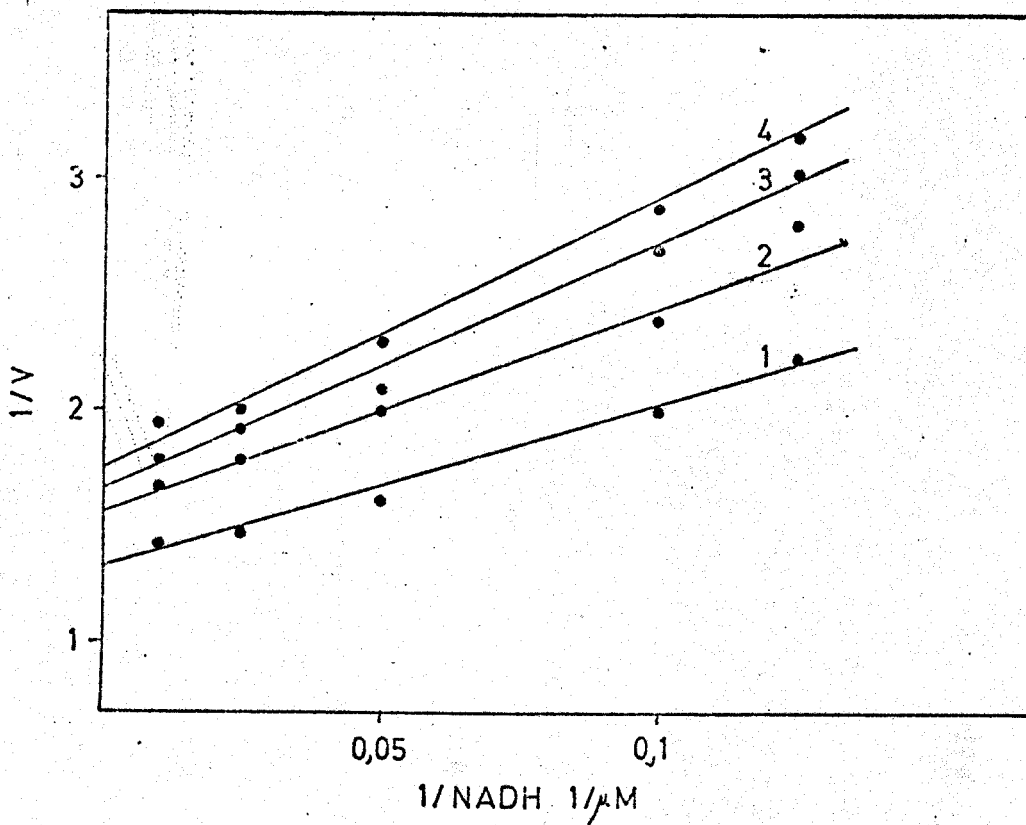


Figura 12. Inhibición por NAD^+ frente a NADH como sustrato variable.

La concentración de citocromo c oxidado fue $10 \mu\text{M}$, y las de NAD^+ : 1, nada; 2, $0,5 \text{ mM}$; 3, 1 mM ; 4, 2 mM .

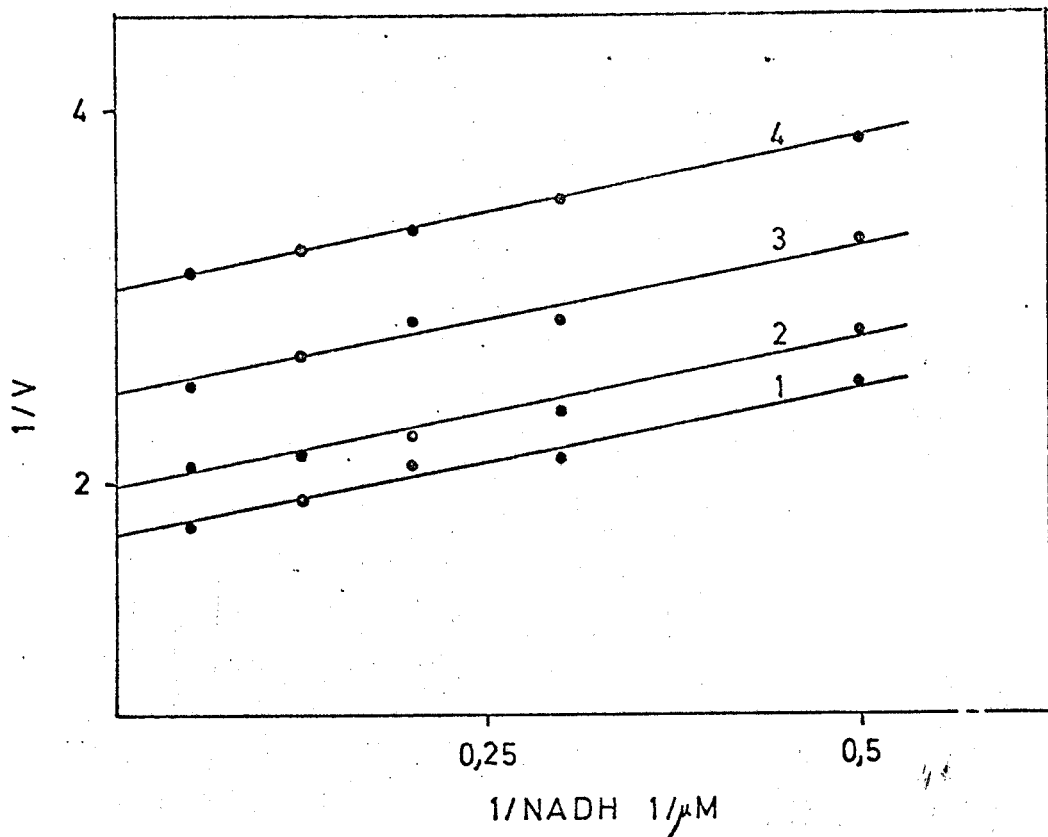


Figura 13. Velocidades iniciales de la actividad NADH-nitrato reductasa a concentración de NADH variable. Las concentraciones de NO_3K fueron: 1, 2 mM; 2, 0,5 mM; 3, 0,166 mM; 4, 0,1 mM.

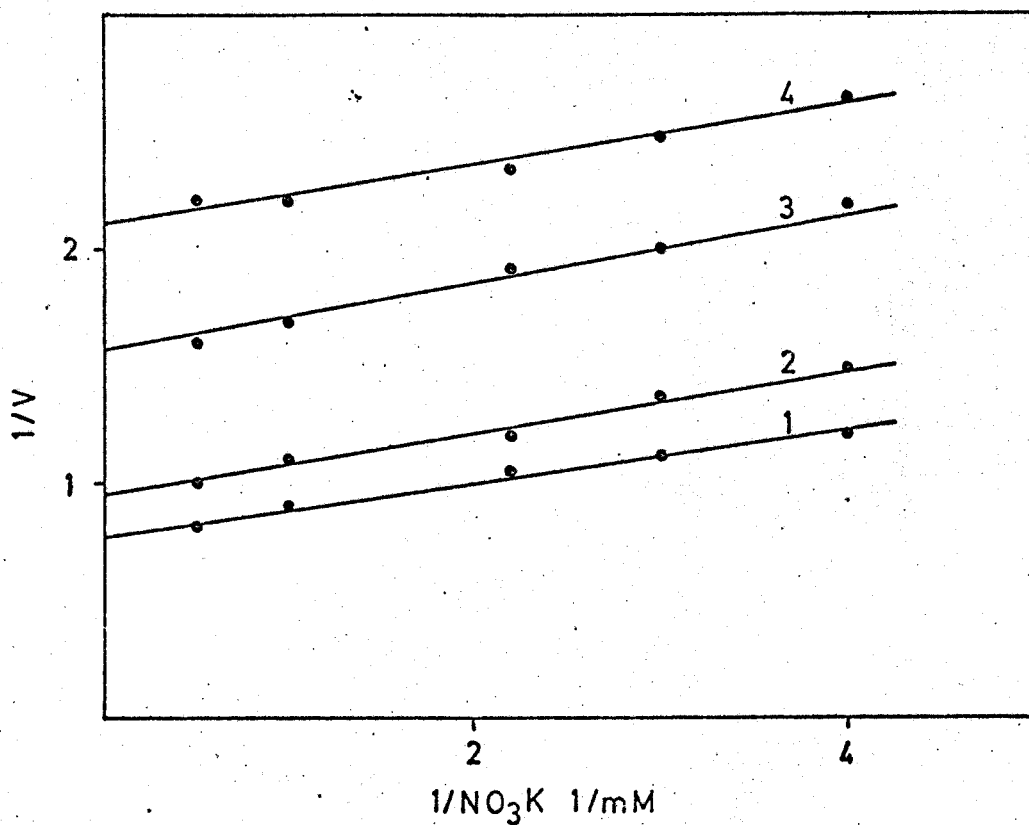


Figura 14. Velocidades iniciales de la actividad NADH-nitrato reductasa a concentración de NO_3K variable. Las concentraciones de NADH fueron: 1, 20 μM ; 2, 10 μM ; 3, 2 μM ; 4, 1 μM .

traciones del sustrato variable, para distintas concentraciones del sustrato fijo. En los dos casos aparece una distribución de rectas paralelas, típicas del mecanismo Ping Pong Bi Bi (76), que se ajusta a la ecuación ya expuesta en el caso de la NADH-citocromo c reductasa.

A partir de las representaciones secundarias (Fig. 15 y 16) se obtuvieron los valores para K_a y K_b : $K_a = 1,8 \mu\text{M}$ (considerando el NADH como sustrato A) y $K_b = 150 \mu\text{M}$ (con NO_3K como sustrato B).

2.4.2. Inhibición por producto

El nitrito frente al nitrato produce una inhibición de tipo no competitivo (Fig. 17). El mismo tipo de inhibición aparece al estudiar el nitrito frente a NADH (Fig. 18).

Por otra parte, el NAD^+ frente a NADH se muestra como inhibidor competitivo (Fig. 19), para una concentración saturante de nitrato. El NAD^+ frente a nitrato no se pudo estudiar debido a la contaminación de nitrato

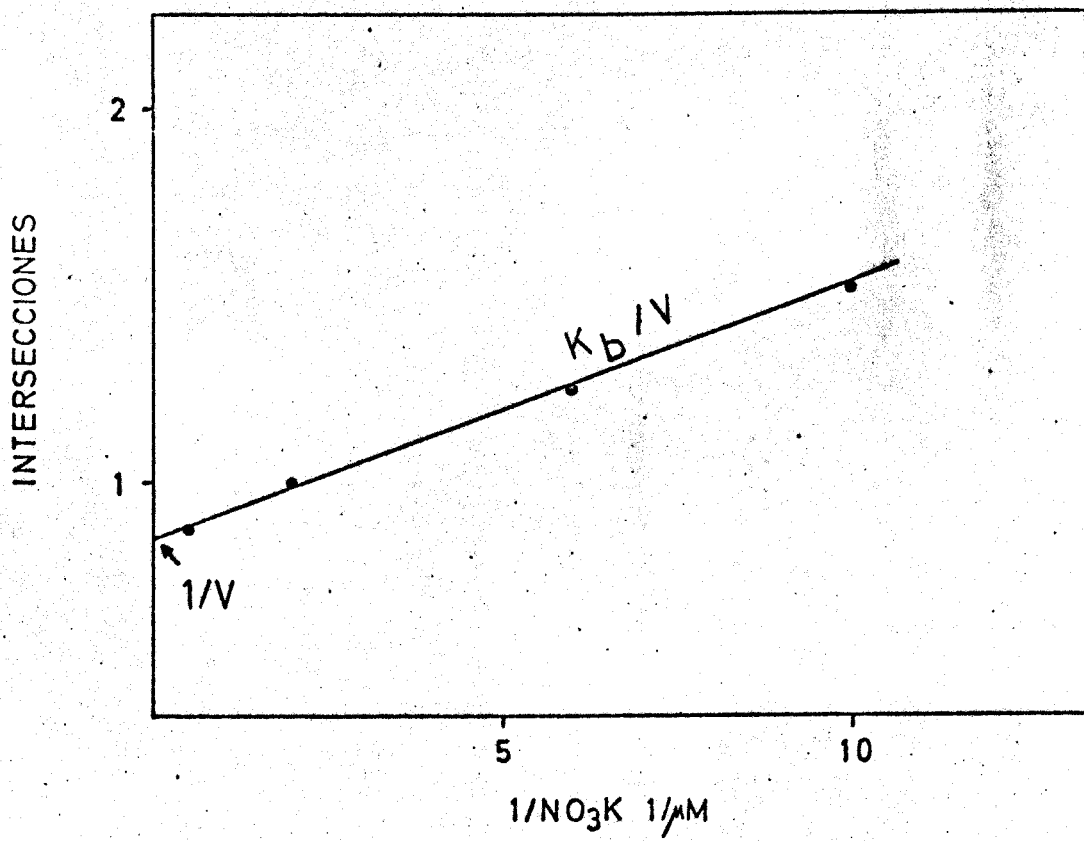


Figura 15. Representación de las intersecciones de la Fig. 13 con respecto a $1/\text{NO}_3\text{K}$.

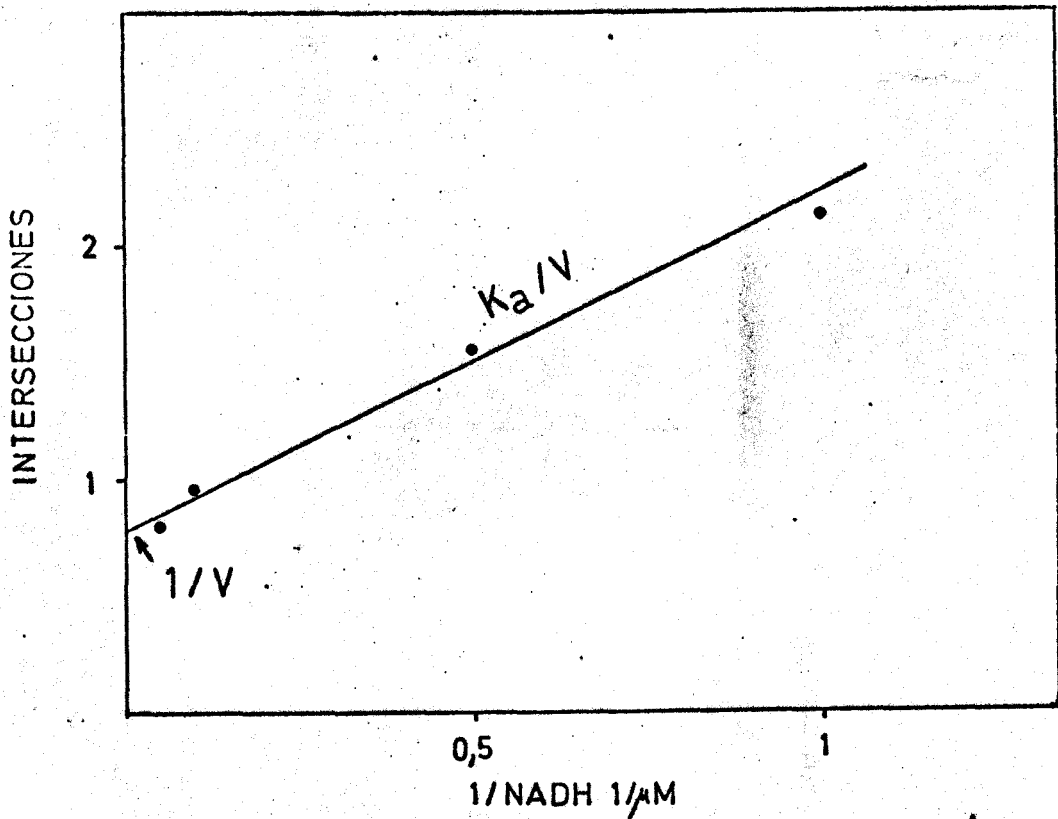


Figura 16. Representación de las intersecciones de la Fig. 14 con respecto a $1/\text{NADH}$.

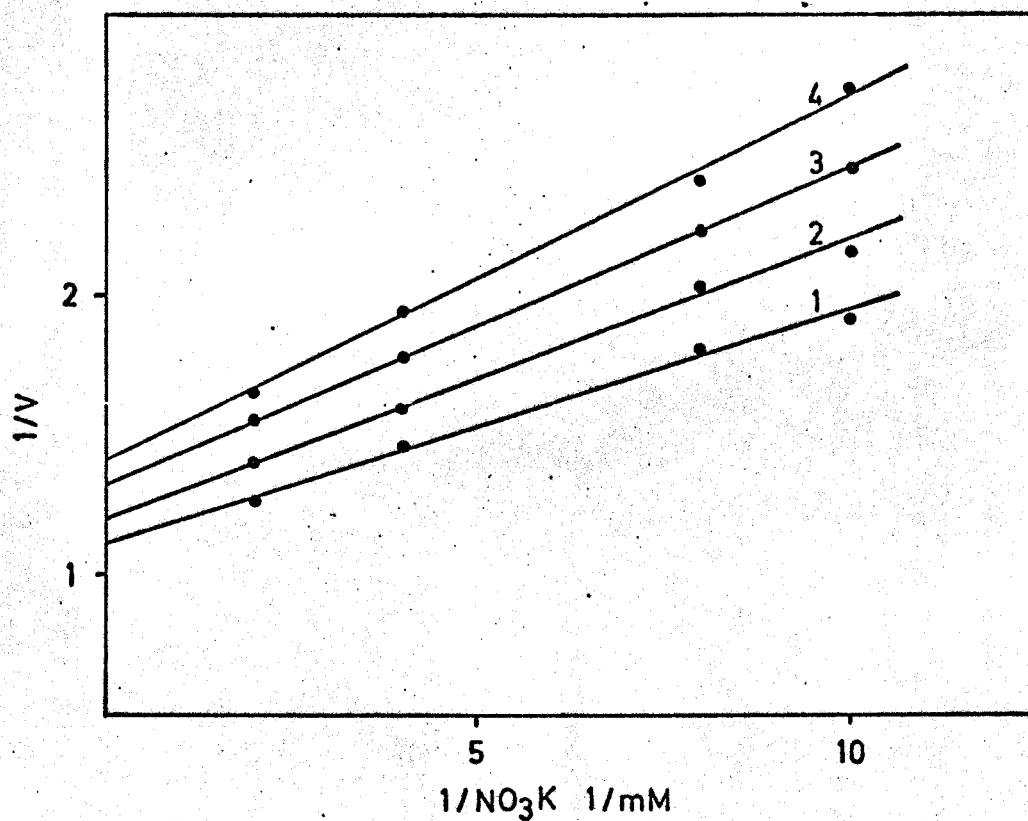


Figura 17. Inhibición por NO_2K frente a NO_3K como sustrato variable.

La concentración de NADH fue $30 \mu\text{M}$, y las de NO_2K : 1, nada; 2, $0,2 \text{ mM}$; 3, $0,3 \text{ mM}$; 4, $0,5 \text{ mM}$.

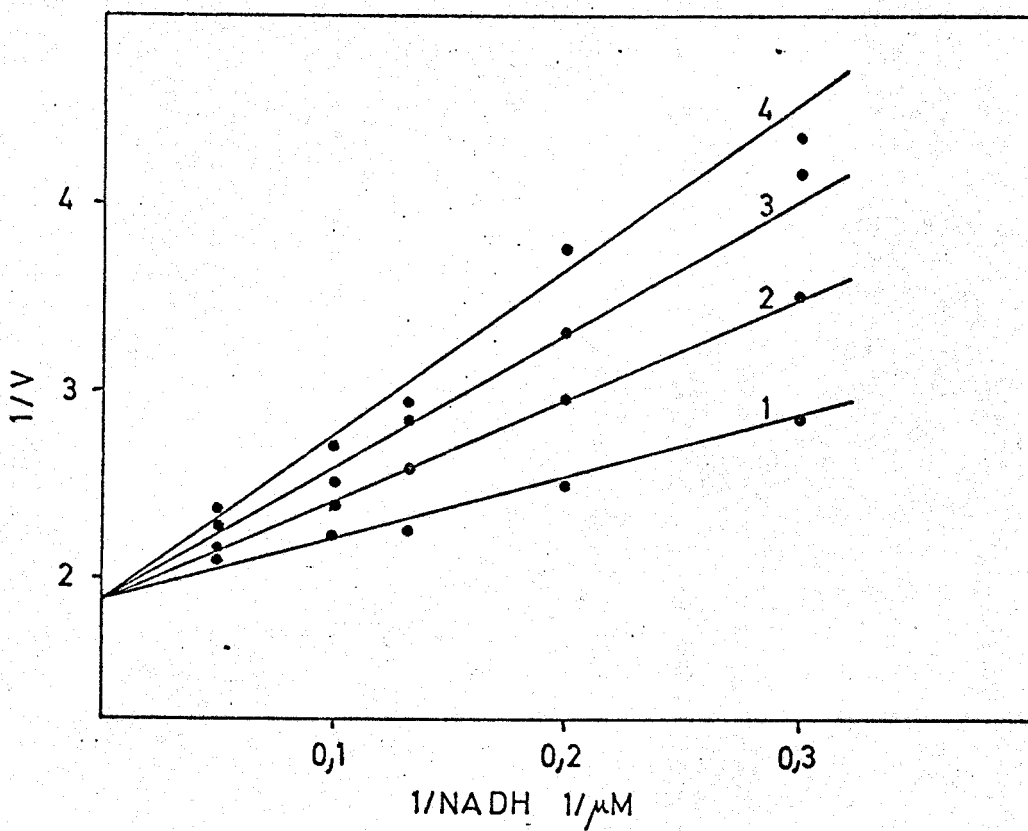


Figura 19. Inhibición por NAD^+ frente a NADH como sustrato variable.

La concentración de NO_3K fue 10 mM, y las de NAD^+ : 1, nada; 2, 0,5 mM; 3, 1 mM; 4, 2 mM.

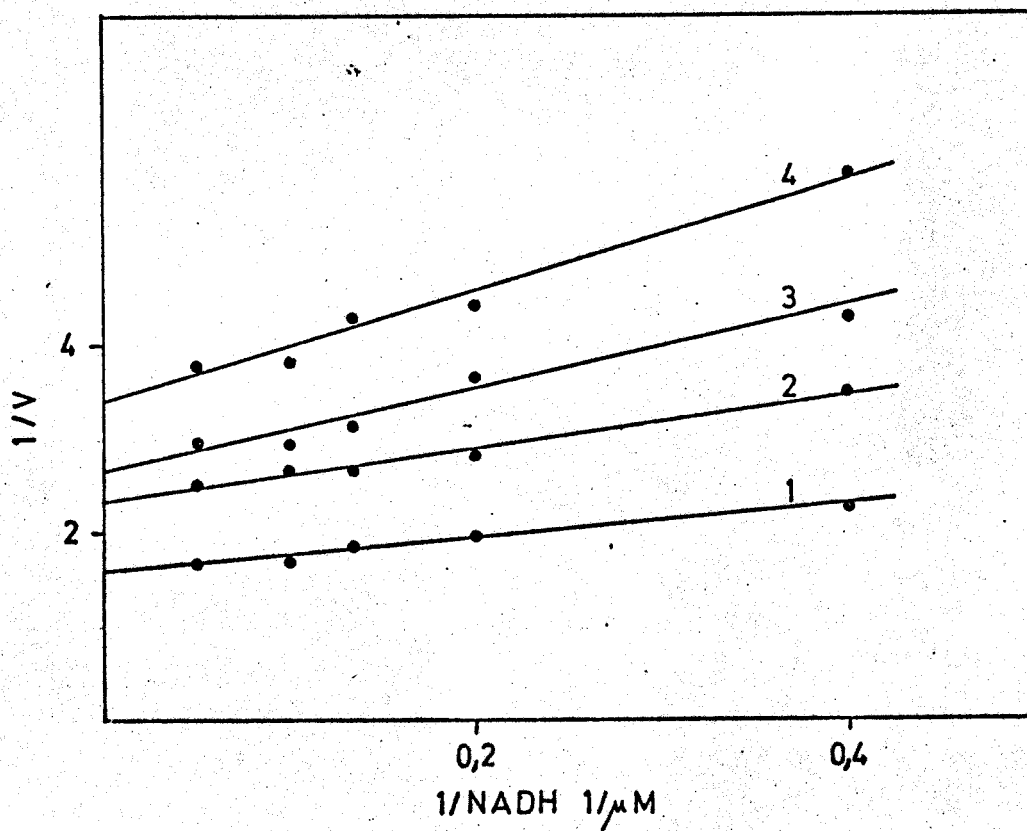


Figura 18. Inhibición por NO_2K frente a NADH como sustrato variable.

La concentración de NO_3K fue 0,5 mM, y las de NO_2K : 1, nada; 2, 0,5 mM; 3, 1 mM; 4, 2 mM.

que llevan las preparaciones comerciales de NAD^+ . Es interesante conocer esta inhibición, aunque no es esencial para la determinación del mecanismo cinético.

3. ACCION DE LOS AGENTES DESNATURALIZANTES SOBRE LA NITRATO REDUCTASA

3.1. Efecto del pH

3.1.1. Efecto del pH sobre las tres actividades del complejo

Como se puede observar en la Fig. 20, donde se muestra las curvas de estabilidad de las actividades del complejo, éstas son bastante estables entre pH 6,5 y 8,5. Fuera de este intervalo existe una clara pérdida de actividad, no encontrándose diferencias significativas entre las distintas actividades, salvo la NADH-diaforasa que a pHs básicos es algo más estable que las otras dos.

La presencia de FAD en el medio aumenta la estabilidad de las tres actividades (Fig. 21), aunque el efecto es mayor en la diaforasa.

3.1.2. Inactivación reversible de la actividad NADH-nitrato reductasa a pHs ácidos

La inactivación de la NADH-nitrato reductasa a pH

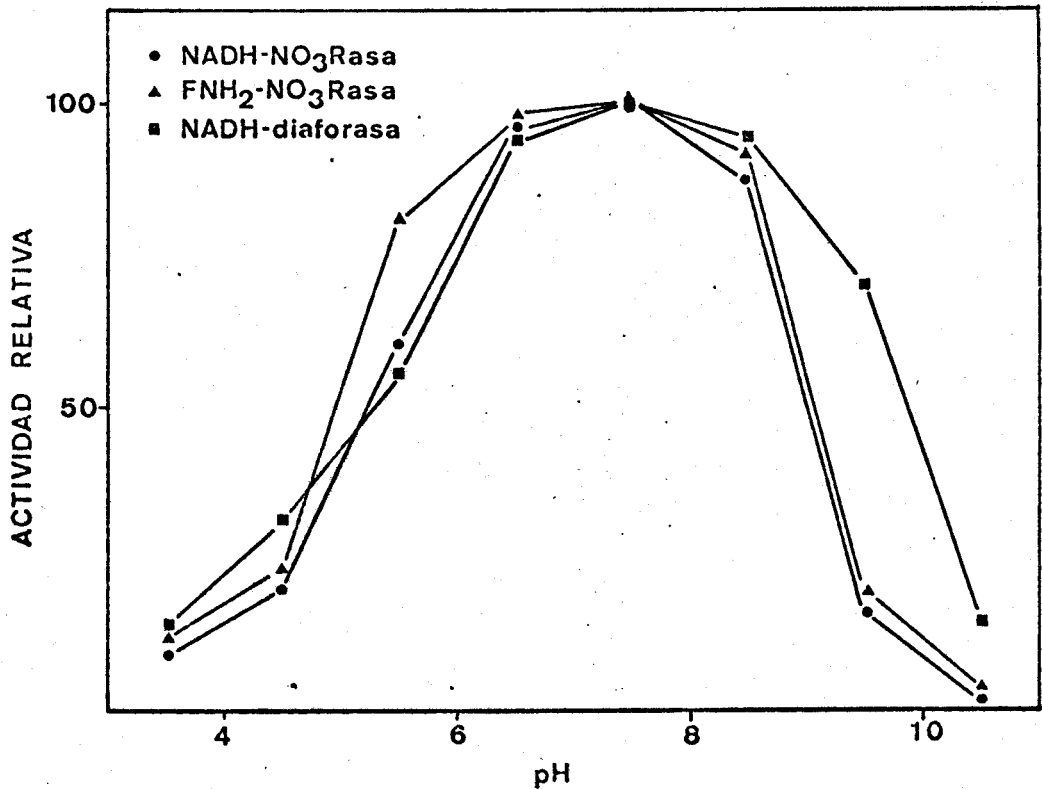


Figura 20. Efecto del pH en la estabilidad de la nitrato reductasa en ausencia de FAD.

La nitrato reductasa (2mg/ml) se incubó a 25°C en presencia de las soluciones tampón que se detallan en la leyenda de la Fig. 2 y EDTA 1mM. Al cabo de 1 hora de incubación, las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las mezclas, expresándose como porcentajes de las correspondientes actividades del control a pH 7,5 y al tiempo cero de incubación.

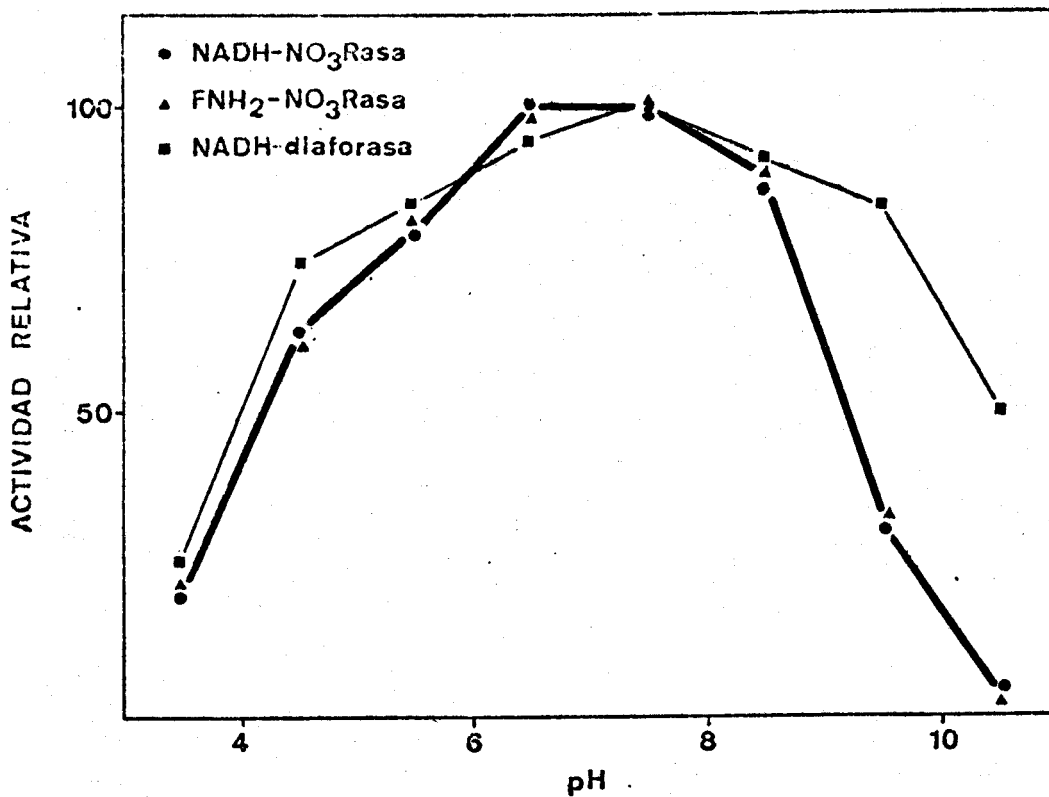


Figura 21. Efecto del pH en la estabilidad de la nitrato reductasa en presencia de FAD.

Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que se detallan en la Fig. 3, pero incluyendo FAD 20 μ M en las mezclas de incubación.

ácido es parcialmente reversible. Al ajustar el pH de las preparaciones inactivadas a pH 4,5 y 3,5 a 7,5 (Fig. 22 y 23), se recupera del 50 al 70% de la actividad original. La reactivación que se logra depende del grado de inactivación alcanzado.

3.1.3. Efecto del pH en la inactivación por NADH

La inactivación de la nitrato reductasa por incubación con NADH depende del pH en el que se efectúa la incubación.

En la Fig. 24 se presenta la cinética de inactivación a varios pHs. A los pHs 5,5 y 6,5 el enzima conserva al cabo de una hora, el 100% y el 80% de la actividad respectivamente; mientras que a pHs 7,5 y 8,5 la inactivación es completa a los 30 minutos, siendo más rápida a pH 8,5.

3.1.4. Estabilidad de la capacidad de inactivación por NADH a distintos pHs

La capacidad de inactivación del enzima por NADH se ve afectada por preincubación a distintos pHs. En la Fig. 25 se muestra la inactivación por NADH a pH 7,5 de

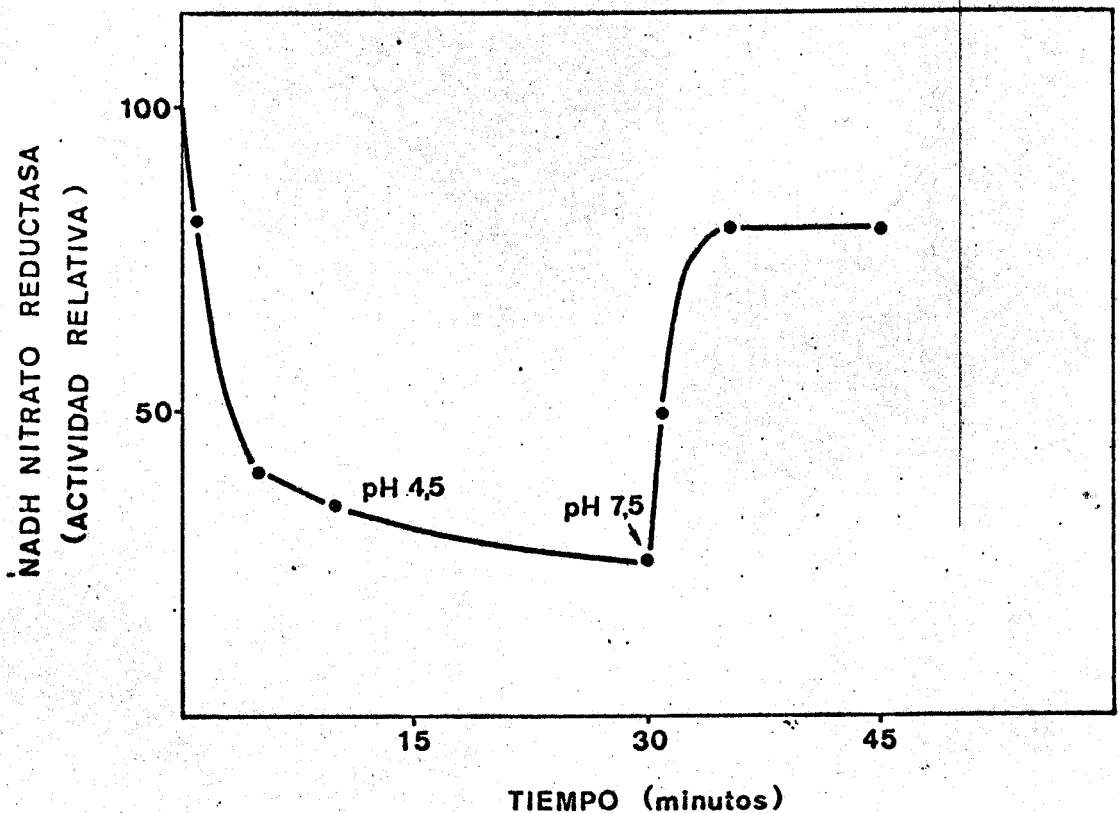


Figura 22. Inactivación reversible de la NADH-nitrato reductasa a pH 4,5.

La nitrato reductasa (2 mg/ml) se incubó a 0°C en presencia de solución tampón citrato-fosfato 0,025 M (pH 4,5), FAD 20 μ M, NO_3K 10 mM y EDTA 1 mM. Al tiempo que se indica en la figura se añadió a la mezcla un volumen igual de solución de fosfato potásico 0,5 M (pH 7,5), FAD 20 μ M, NO_3K 10 mM y EDTA 1 mM. La actividad enzimática se determinó en alícuotas de la mezcla a los tiempos que se indican.

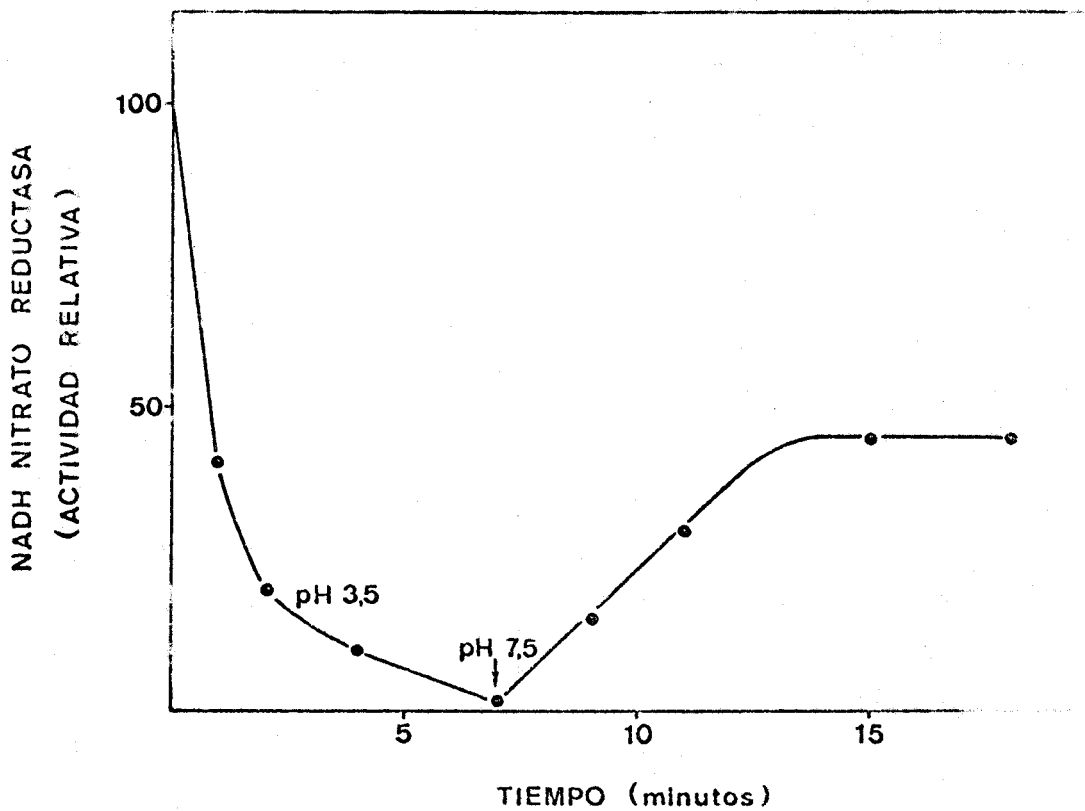


Figura 23. Inactivación reversible de la NADH-nitrato reductasa a pH 3,5.

Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que se detallan en la leyenda de la Fig. 22, pero efectuando la incubación del enzima a 25°C y la primera parte de ésta a pH 7,5.

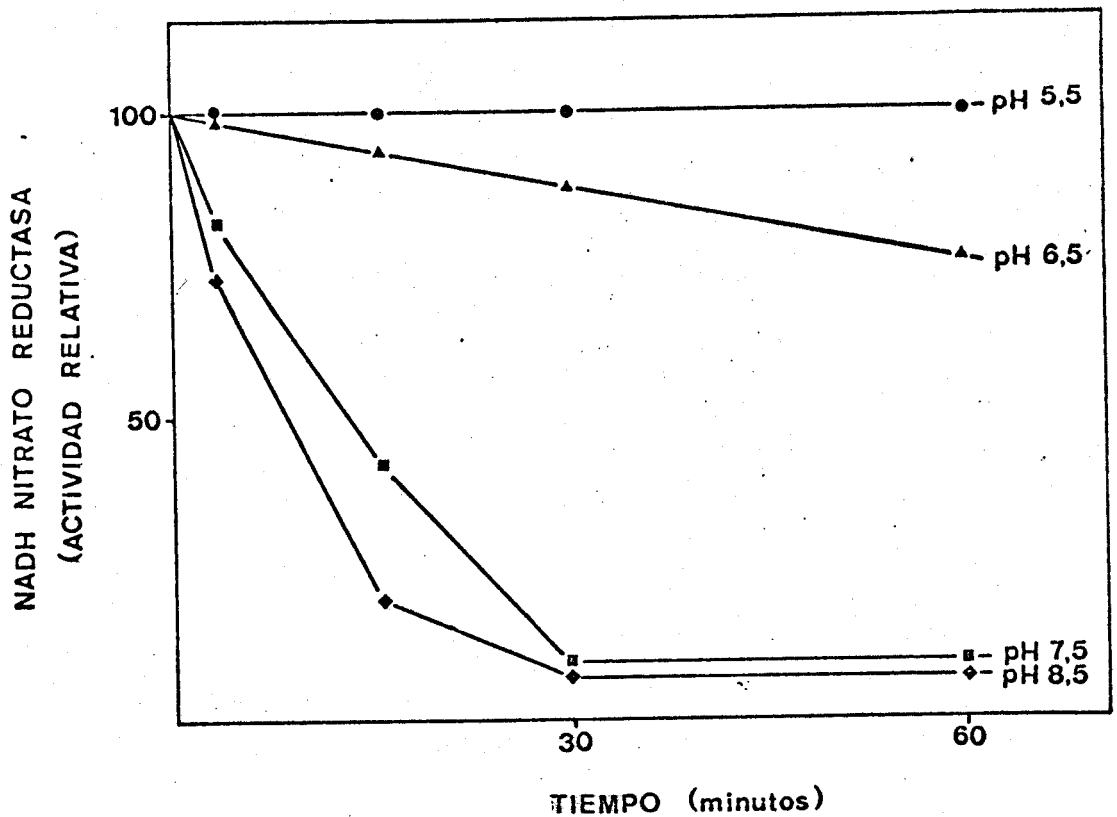


Figura 24. Efecto del pH en la inactivación de la nitrato reductasa por NADH.

La nitrato reductasa (1,5mg/ml) se incubó a 25°C en presencia de FAD 20µM, EDTA 1mM, NADH 0,5mM y las soluciones tampón que se detallan en la Fig. 2 para los pHs indicados en la presente figura.

La actividad enzimática se determinó en alícuotas de las mezclas a los tiempos que se indican, y se expresa como porcentaje de la del correspondiente control sin NADH.

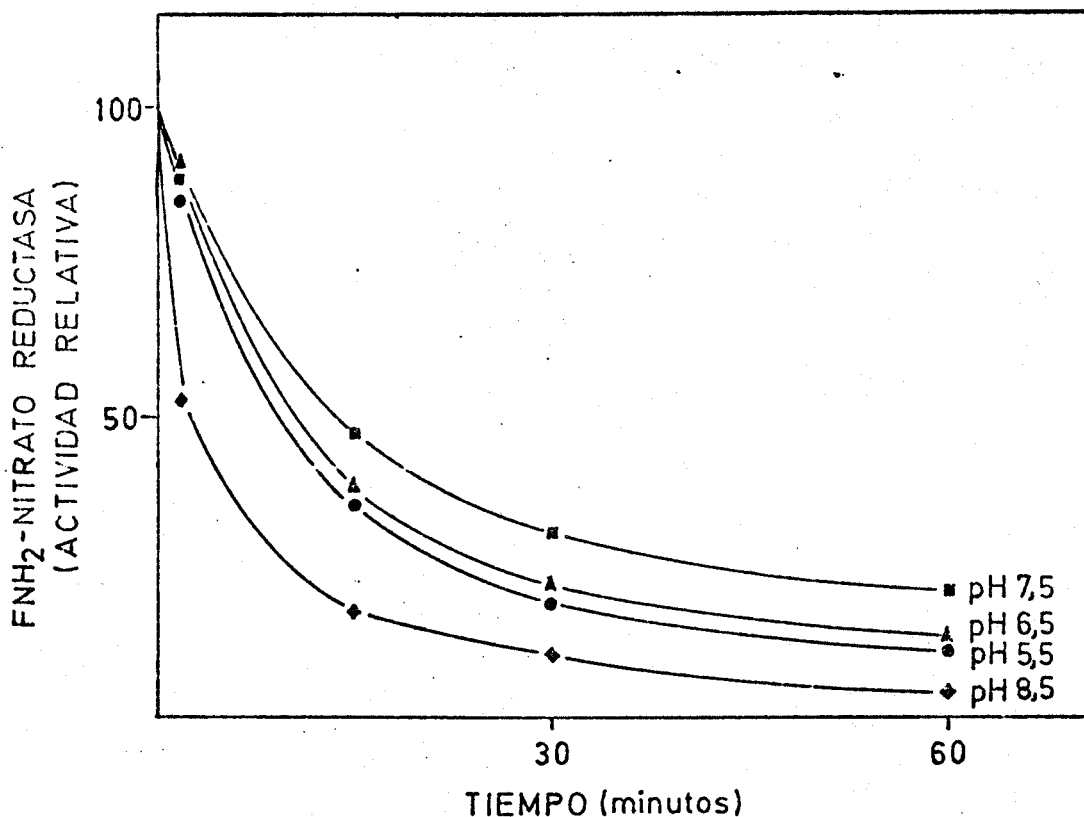


Figura 25.-Efecto del pH en la estabilidad de la capacidad de inactivación de la nitrato reductasa por NADH.

La nitrato reductasa (1,5 mg/ml) se incubó a 25°C durante 15 minutos en presencia de FAD 20 μ M, EDTA 1mM y las soluciones tampón que se detallan en la Figura 2 para los pHs indicados en la presente figura. Al cabo de los 15 minutos se añadió a cada mezcla un volumen igual de solución tampón fosfato 0,5M (pH 7,5), FAD 20 μ M y EDTA 1mM comprobándose que el pH de cada mezcla era de 7,5.

A continuación las preparaciones anteriores se incubaron a 25°C en presencia de NADH 0,3mM, y a los tiempos que se indican en la figura se determinó la actividad enzimática en alícuotas de las mezclas expresándose como porcentaje de la del correspondiente control sin NADH.

preparaciones preincubadas a los pHs 5,5 6,5 7,5 y 8,5. Como puede verse, la cinética de inactivación es diferente en los distintos casos. La preparación preincubada a 8,5 es la que se inactiva más rápidamente, las otras tres se inactivan de forma similar siendo la más lenta la de pH 7,5.

3.2. Efecto de la temperatura

3.2.1. Estabilidad del enzima a distintas temperaturas

La incubación durante 20 minutos a temperaturas inferiores a 25° C, no produce pérdida de ninguna de las tres actividades de la nitrato reductasa. Temperaturas entre 25 y 50° C afectan a las tres actividades. La NADH-diaforasa y la NADH-nitrato reductasa son las más susceptibles, inactivándose totalmente a partir de los 40° C. La FNH₂-nitrato reductasa es más estable, siendo necesario elevar la temperatura a 50° C para obtener un 90% de inactivación (Fig. 26).

La presencia de FAD en la mezcla de incubación aumenta la estabilidad de las actividades NADH-diaforasa y NADH-nitrato reductasa (Fig. 27).

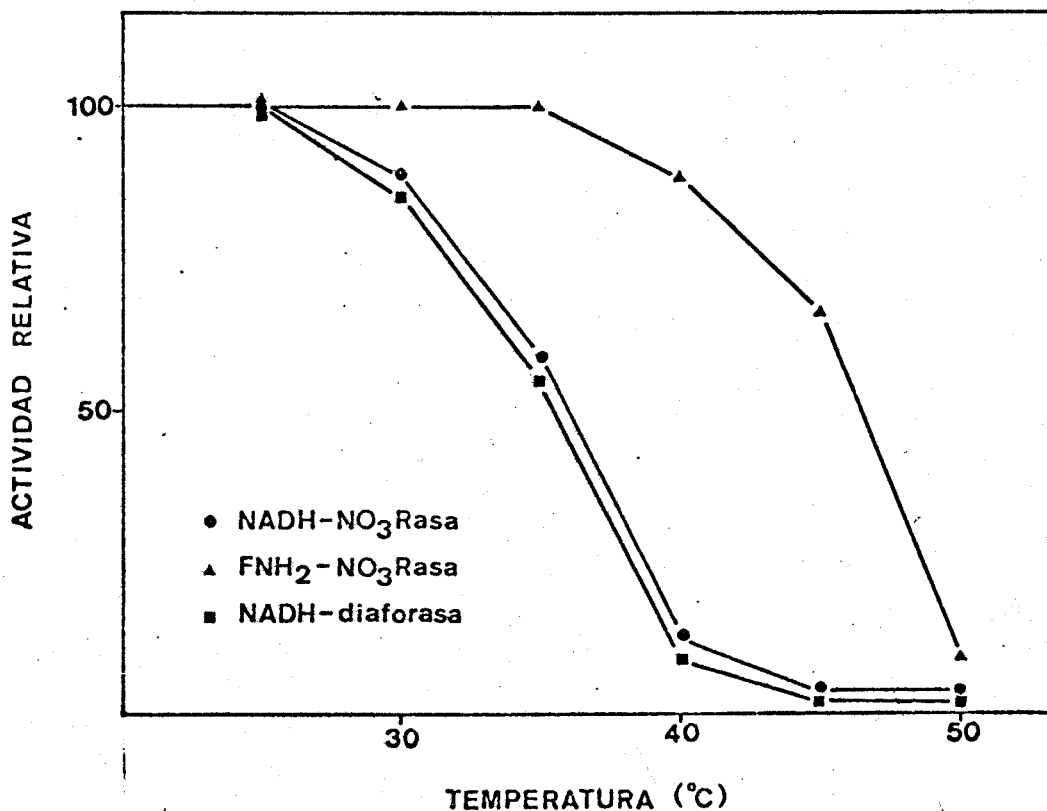


Figura 26. Efecto de la temperatura en la estabilidad de las actividades del complejo nitrato reductasa en ausencia de FAD.

La nitrato reductasa (3mg/ml) se incubó en presencia de fosfato potásico 0,2M (pH 7,5), NO₃K 10mM y EDTA 1mM, a las temperaturas que se indican. Al cabo de 20 minutos, se determinaron las actividades enzimáticas en alícuotas de las mezclas, expresándose como porcentajes de las correspondientes actividades iniciales.

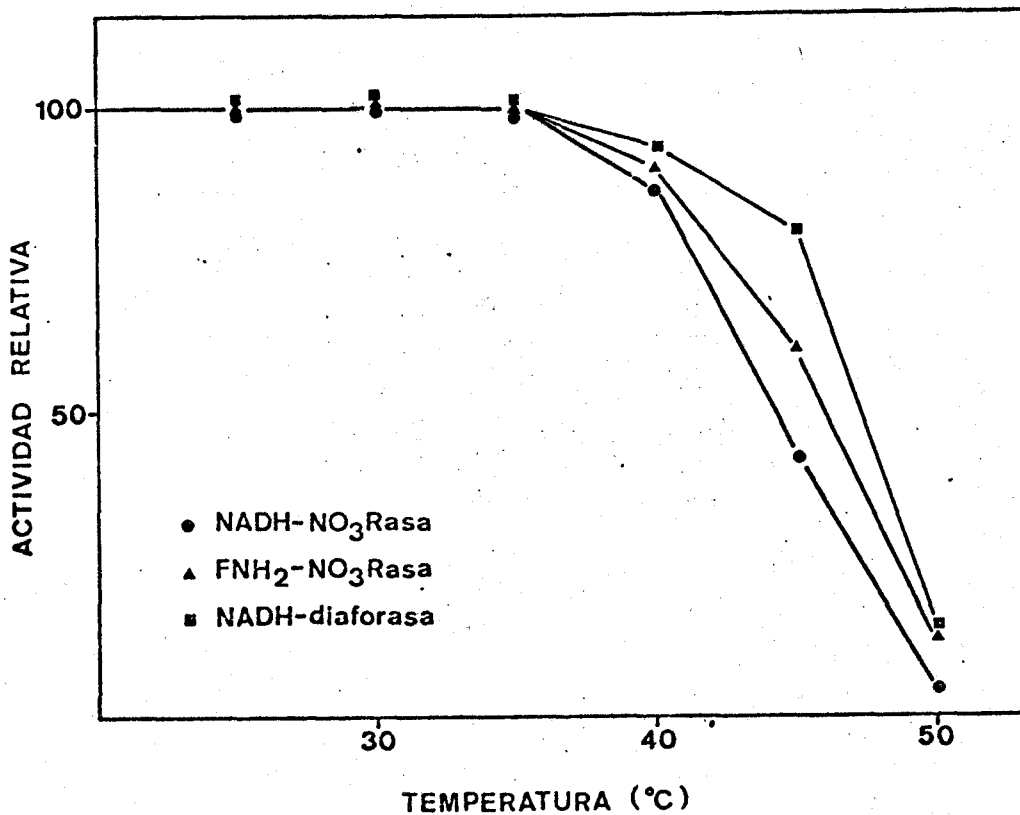


Figura 27. Efecto de la temperatura en la estabilidad de las actividades del complejo nitrato reductasa en presencia de FAD.

Se utilizaron las mismas condiciones experimentales que se detallan en la leyenda de la Fig. 26, pero incluyendo FAD 20 μ M en las mezclas de incubación.

3.2.2. Efecto de la incubación a distintas temperaturas sobre la capacidad de inactivación por NADH y la actividad diaforásica

La incubación a distintas temperaturas en ausencia de FAD produce la inactivación de la NADH-diaforasa, la cual, es paralela a la pérdida de la capacidad de inactivación por NADH, aunque no existe una correlación total entre los dos procesos (Fig. 28).

3.3. Efecto de la urea

La urea, a concentraciones que varían entre 2 y 6 M, inactiva de un modo semejante a las tres actividades del complejo nitrato reductasa. La presencia de FAD 20 μ M en la mezcla de incubación tiene un efecto protector selectivo sobre la diaforasa (Tabla II). Urea 4 M en presencia de FAD, inactiva casi totalmente las actividades FNH₂-nitrato reductasa y NADH-nitrato reductasa y no produce pérdida apreciable de la NADH-diaforasa.

En la Fig. 29, se representan las cinéticas de inactivación de la NADH-diaforasa con urea 3M en presencia

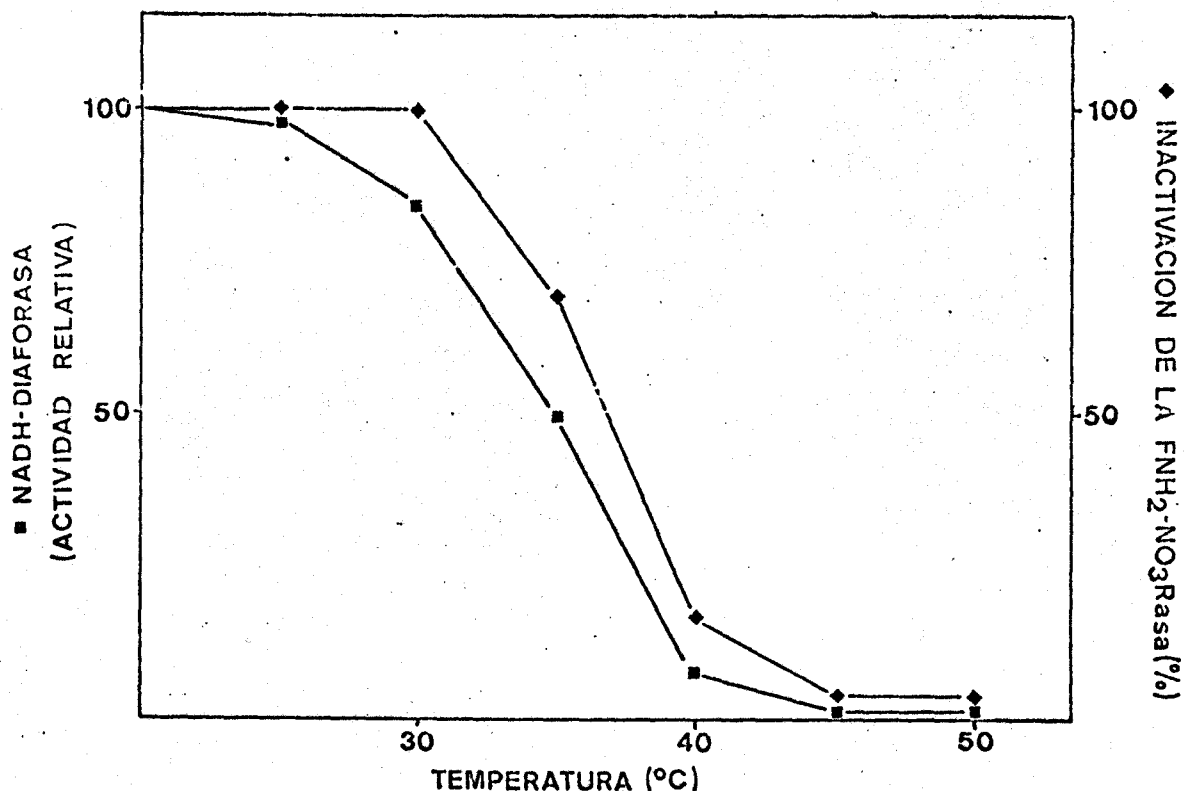


Figura 28. Estabilidad a distintas temperaturas y en ausencia de FAD de la NADH-diaforasa y la capacidad de inactivación por NADH.

La nitrato reductasa (10 mg/ml) se incubó en presencia de fosfato potásico 0,2 M (pH 7,5) y EDTA 1 mM a las temperaturas que se indican. Al cabo de 15 minutos de incubación se determinaron en alícuotas de las mezclas la actividad NADH-diaforasa y la inactivación por NADH de la FNH₂-nitrato reductasa del mismo modo que se indica en la leyenda de la Fig. 24.

Tabla II

EFECTO DE LA UREA SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO
NITRATO REDUCTASA

UREA (M)	ACTIVIDADES RELATIVAS		
	NADH-NO ₃ Rasa	FNH ₂ -NO ₃ Rasa	NADH-diaforasa
0	100	100	100
2	70	70	95
4	10	15	90
6	0	0	10

La nitrato reductasa (3mg/ml) se incubó a 25°C en presencia de fosfato potásico 0,2M (pH 7,5), FAD 20μM, NO₃K 10mM, EDTA 1mM y urea a las concentraciones que se indican en la tabla. Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las mezclas al cabo de 20 minutos de incubación.

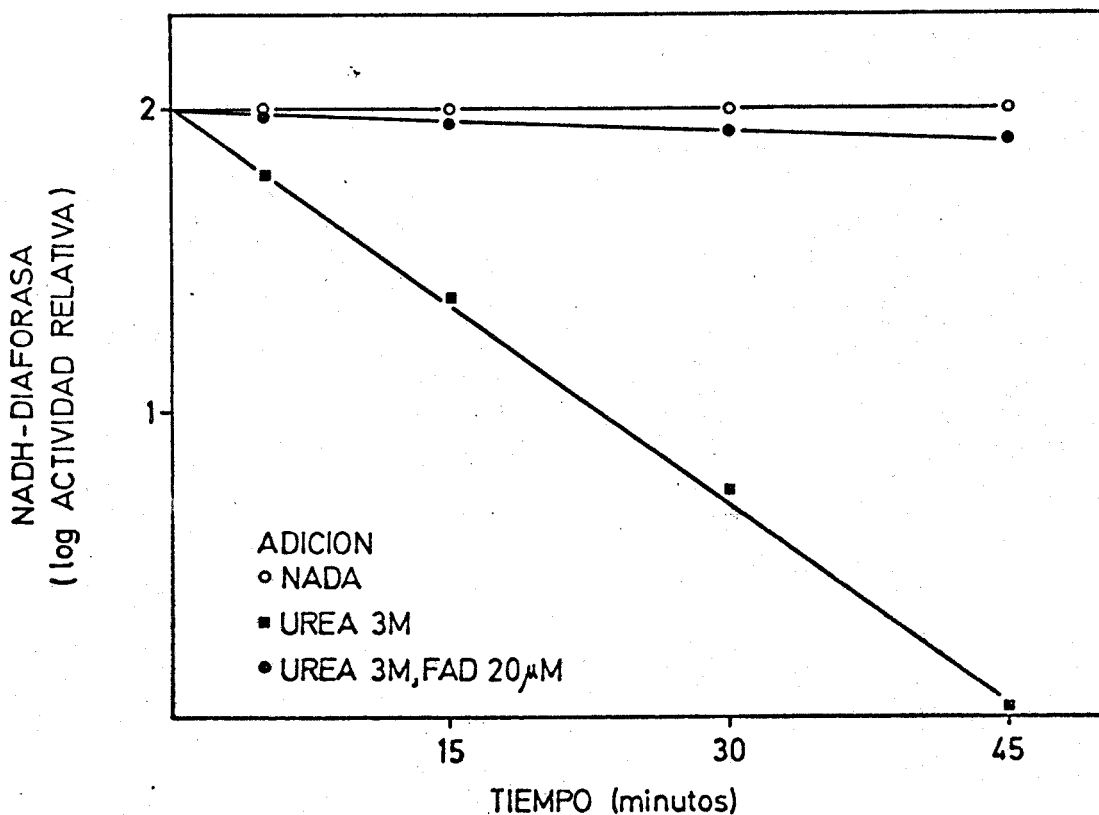


Figura 29.-Efecto del FAD sobre la inactivación de la NADH-diaforasa por urea.

La nitrato reductasa (5mg/ml) se incubó a 25°C en presencia de fosfato potásico 0,2M (pH 7,5), NO_3K 10mM. y EDTA 1mM; además de estos compuestos se incluyó urea 3M (■), y urea 3M más FAD 20µM (●). La actividad enzimática se determinó en alícuotas de las mezclas a los tiempos que se indican.

y ausencia de FAD 20 μ M. A los 45 minutos de incubación la preparación sin FAD carecía de actividad diaforasa, mientras la que lleva FAD la conservaba casi en su totalidad.

3.3.2. Reactivación de un enzima tratado con urea

El enzima inactivado con urea, se puede reactivar parcialmente al disminuir la concentración de urea por dilución de la mezcla inactivante.

En la Fig. 30 puede observarse la reactivación de un enzima tratado con urea entre 1 y 4 M. En las preparaciones tratadas con 1 y 2 M de urea se alcanzaba el máximo de reactivación en menos de dos minutos, obteniéndose el 85 y el 70% de la actividad original, respectivamente; en las tratadas con 3 y 4 M de urea la reactivación fue más lenta, alcanzándose el 10 y el 5% de la actividad original, respectivamente.

3.3.3. Posible disociación del complejo enzimático

El tratamiento con urea y DTE es posible que produzca la disociación en subunidades del complejo enzimá-

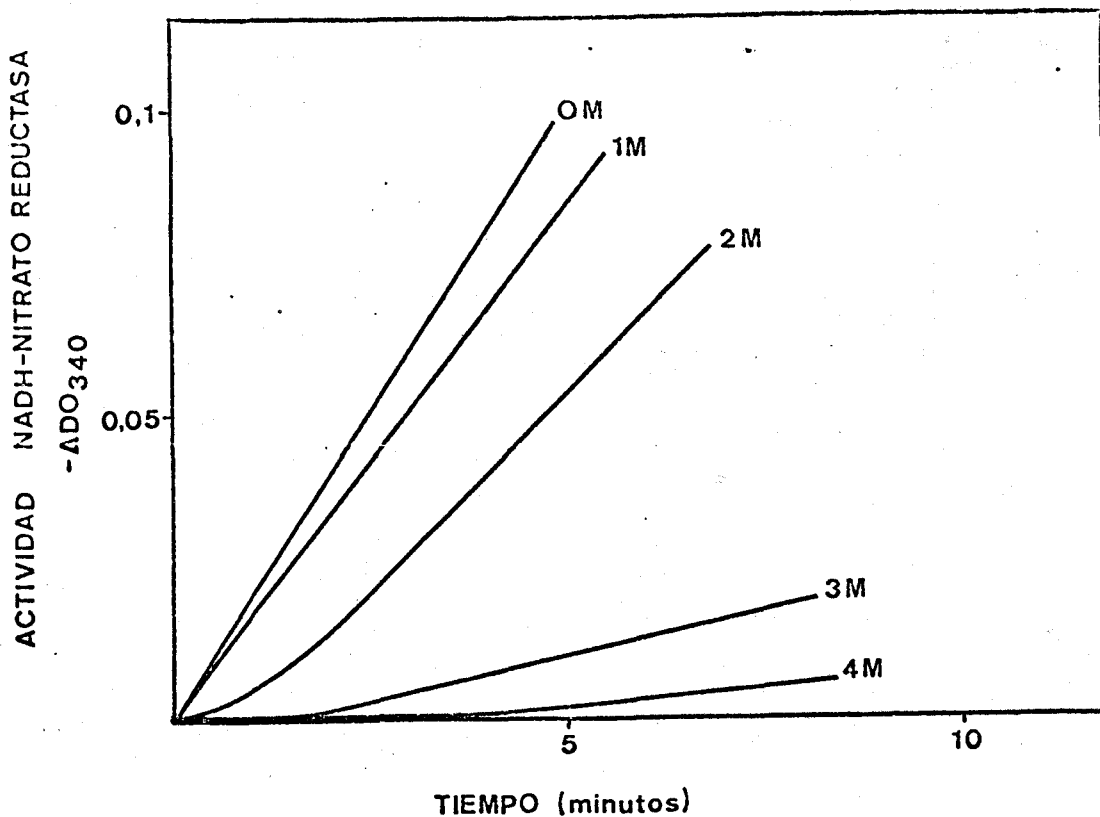


Figura 30.-Reactivación de una preparación tratada con urea.

La nitrato reductasa (10mg/ml) se incubó a 4°C en presencia de fosfato potásico 0,2M (pH 7,5), $\text{NO}_3\text{-K}$ 10mM, EDTA 1mM, FAD 20mM y urea a las concentraciones que se indican. Al cabo de 35 minutos de incubación se determinó la actividad NADH- NO_3 Rasa tomando alícuotas de las preparaciones que se diluyeron 60 veces en la mezcla de ensayo. La actividad se siguió espectrofotométricamente durante unos minutos hasta observar la máxima reactivación.

tico (59,64,77,78). Por esta razón, se sometió una preparación enzimática a ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, en presencia de urea, DTE y FAD (59,60). En el transcurso de la centrifugación se inactivó por efecto de la urea el 75% de las actividades FNH_2 -nitrato reductasa y NADH-nitrato reductasa, mientras que la actividad NADH-diaforasa se conservó casi en su totalidad debido al efecto protector del FAD. En la Fig. 31 se representan las tres actividades en las fracciones obtenidas de la solución centrifugada. Sólomente las fracciones 6 y 7 contienen las tres actividades, mientras que en las fracciones 8 y 9 solo la NADH-diaforasa es activa.

Los anteriores resultados indican que en las fracciones 6 y 7, más cercanas al fondo y por lo tanto de mayor peso molecular, se encuentra el complejo intacto con las tres actividades; mientras que en las fracciones 8 y 9, de menor peso molecular, se encuentra una porción del complejo que es solo activo para la NADH-diaforasa. Al parecer, existe disociación del complejo enzimático, perdiéndose en la disociación la actividad FNH_2 -nitrato reductasa (53,54,55,84,85,86).

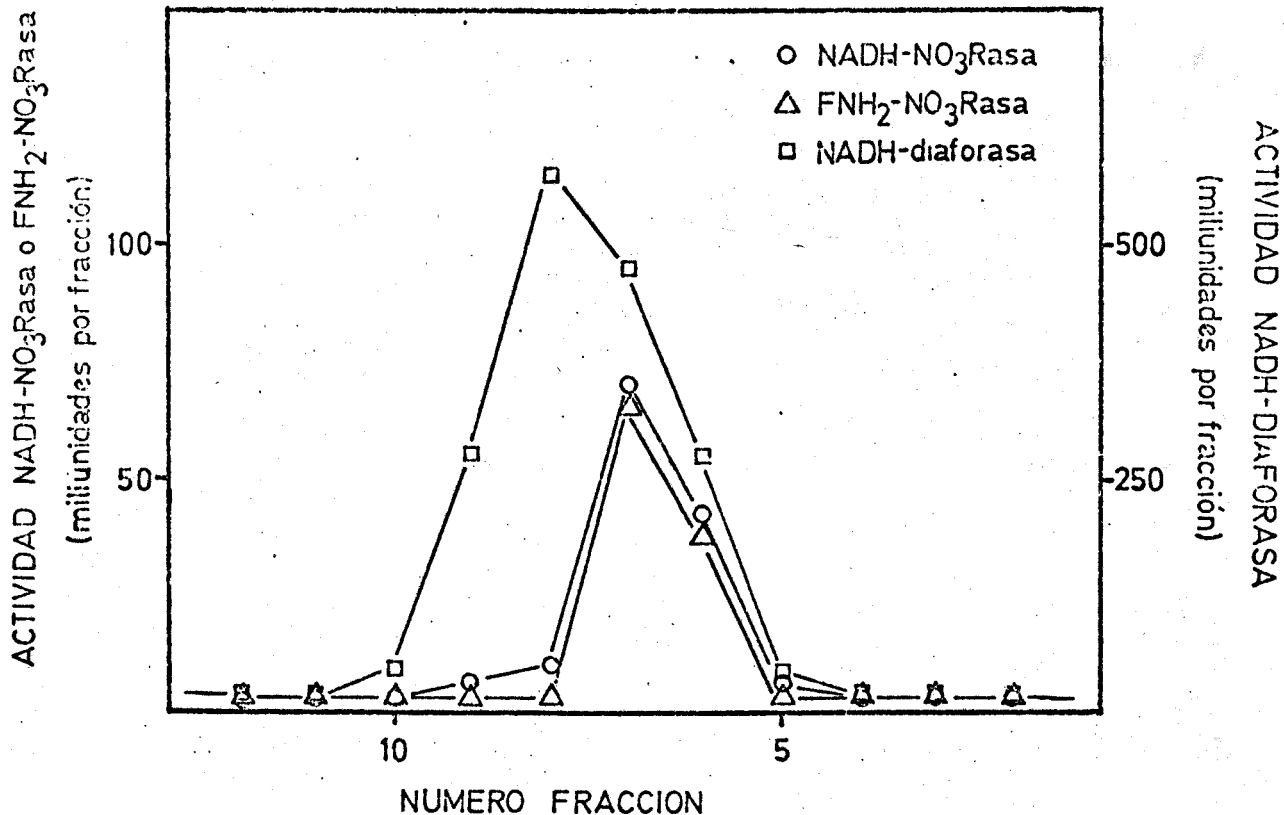


Figura 31. Centrifugación en gradiente de sacarosa y en presencia de urea y DTE de una preparación de nitrato reductasa.

Se colocaron 0,2 ml de enzima (10 mg/ml) en un gradiente del 5 al 20% de sacarosa disuelta en fosfato potásico 0,2 M (pH 7,5), NO₃K 10 mM, EDTA 1 mM, FAD 20 μM, urea 2 M y DTE 0,1 mM. La centrifugación se realizó a 4°C durante 12 horas y a 45.000 r.p.m. Se extrajeron 15 fracciones del tubo de centrifugación, numeradas del 1 al 15 en la figura, la número 1 es la más cercana al fondo.

3.4. Efecto del dodecil sulfato sódico

3.4.1. Acción del dodecil sulfato sódico sobre las actividades del complejo

En la Tabla III se muestra la acción del SDS sobre las distintas actividades de la nitrato reductasa. La actividad diaforasa es más sensible a este tratamiento que la FNH_2 -nitrato reductasa. El SDS al 0,03% inactiva casi totalmente a la NADH-diaforasa y a la NADH-nitrato reductasa, mientras que la FNH_2 -nitrato reductasa conserva el 60% de la actividad original. La presencia de FAD en la mezcla inactivante no tiene efecto protector sobre la actividad diaforasa.

3.4.2. Efecto del dodecil sulfato sódico sobre la capacidad de inactivación del enzima por NADH

El enzima tratado con SDS, el cual carece de actividad diaforasa y presenta actividad FNH_2 -nitrato reductasa, se incubó con NADH estudiándose su efecto inactivante. En la Fig. 32 puede observarse como la preparación tratada con SDS, con una relación NADH-diaforasa/ FNH_2 -nitrato reductasa seis veces menor que el enzima nativo, se

Tabla III

EFEECTO DEL DODECIL SULFATO SODICO SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO NITRATO REDUCTASA

DODECIL SULFATO SODICO (%)	ACTIVIDADES RELATIVAS		
	NADH-NO ₃ Rasa	FNH ₂ -NO ₃ Rasa	NADH-diaforasa
0	100	100	100
0,02	75	90	75
0,03	0	60	5
0,04	0	10	0

La nitrato reductasa(1mg/ml) se incubó a 25°C en presencia de tris-ClH 0,5M(pH 7,5), FAD 20 μ M, NO₃K 10mM, EDTA 1mM, DTE 0,1mM y dodecil sulfato sódico a las concentraciones que se indican en la tabla.Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las mezclas al cabo de 30 minutos de incubación.

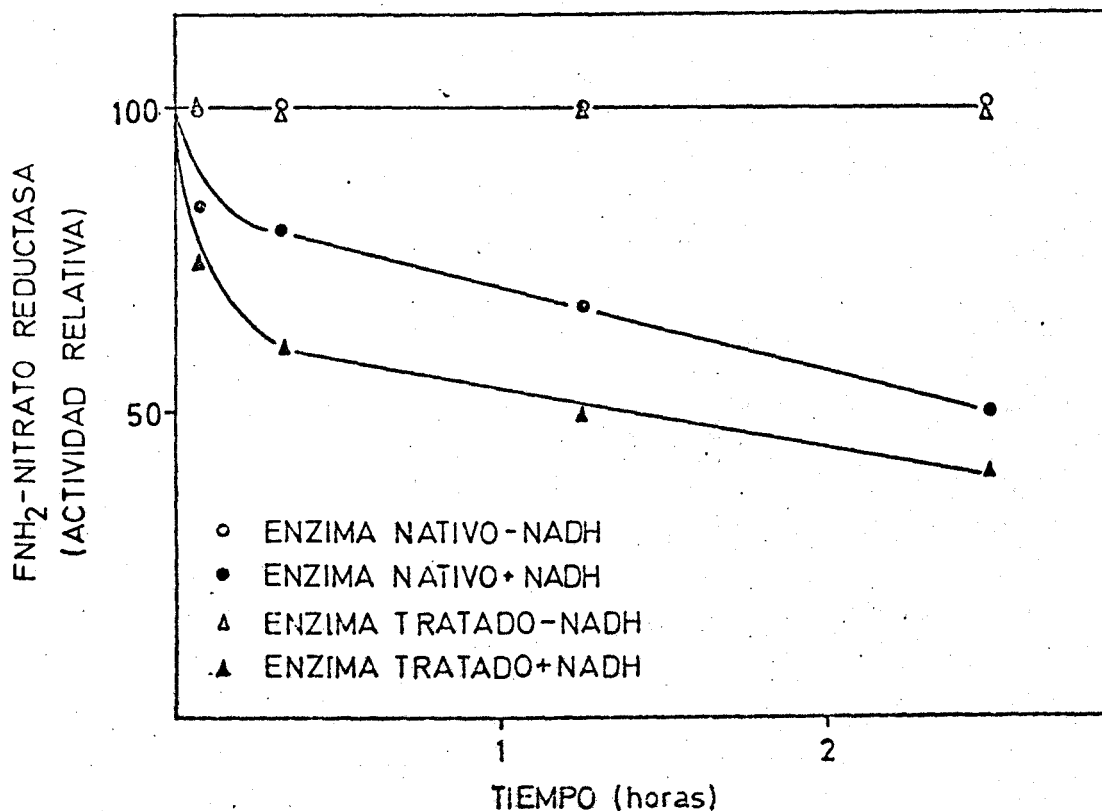


Figura 32.-Inactivación por NADH de un enzima tratado con dodecil sulfato sódico.

El enzima nativo (2mg prot./ml) (○,●) y el tratado con dodecil sulfato sódico (1mg prot./ml) (△,▲) se incubaron a 25°C con Tris-ClH 0,1M (pH 7,5) y EDTA 1mM, en presencia (●,▲) y ausencia (○,△) de NADH 0,6mM. A los tiempos que se indican en la figura se determinó la actividad FNH₂-NO₃Rasa en alícuota de las mezclas.

Para obtener el enzima tratado, la nitrato reductasa (3mg/ml) se incubó a 25°C en presencia de Tris-ClH 0,1M, EDTA 1mM, DTE 0,1mM y dodecil sulfato sódico 0,03% durante 15 minutos. Al cabo de este tiempo se eliminó el dodecil sulfato sódico por paso a través de Sephadex G-25. El enzima así tratado presentaba una actividad NADH-diaforasa que era el 10% de del enzima nativo y una FNH₂-NO₃Rasa del 60%

inactivó en mayor grado que éste.

3.4.3. Efecto sobre la estructura cuaternaria del tratamiento con SDS y DTE

El enzima tratado con SDS 0,03% y DTE 0,1 mM, el cual carece de las actividades NADH-diaforasa y NADH-nitrato reductasa, se sometió a cromatografía de filtración en gel de Sepharosa, presentando un volumen de elución igual al de la preparación nativa. Esto indica que en la preparación tratada se encuentra el complejo enzimático íntegro, aunque sólo muestre actividad FNH₂-nitrato reductasa.

3.5. Efecto del clorhidrato de guanidina

3.5.1. Acción del clorhidrato de guanidina sobre las actividades del complejo enzimático

El clorhidrato de guanidina actúa sobre el complejo enzimático afectando por igual las tres actividades. La presencia de FAD 20 µM en la mezcla de incubación protegió selectivamente la actividad NADH-diaforasa (Tabla IV). Con

Tabla IV

EFEECTO DEL CLORHIDRATO DE GUANIDINA SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL COMPLEJO NITRATO REDUCTASA

CLORHIDRATO GUANIDINA (M)	ACTIVIDADES RELATIVAS		
	NADH-NO ₃ Rasa	FNH ₂ -NO ₃ Rasa	NADH-diaforasa
0	100	100	100
0,5	90	85	100
1	20	20	95

La nitrato reductasa(10mg/ml) se incubó a 25°C en presencia de fosfato potásico 0,2M(pH 7,5), FAD 20μM, NO₃K 10mM, EDTA 1mM y clorhidrato de guanidina a las concentraciones que se indican en la tabla.Las actividades enzimáticas se determinaron en alícuotas de las mezclas al cabo de 30 minutos de incubación.

clorhidrato de guanidina 1 M y FAD 20 μ M se inactivaron la FNH₂-nitrato reductasa y NADH-nitrato reductasa en un 80%, mientras que la diaforasa sólo se inactivó en un 5%.

La Fig. 33 muestra la cinética de inactivación por clorhidrato de guanidina de la NADH-diaforasa, en presencia y ausencia de FAD. A los 30 minutos de incubación la preparación sin FAD está inactivada en un 90%, mientras la que lleva FAD solo lo está en un 10%, quedando claro el efecto protector del FAD sobre esta actividad.

3.5.2. Efecto del clorhidrato de guanidina sobre la capacidad de inactivación del enzima por NADH

La capacidad de inactivación por NADH es algo mayor en el enzima tratado con clorhidrato de guanidina que en el enzima nativo. En la Fig. 34 se representan las cinéticas de inactivación, apreciándose que el enzima tratado se inactiva más rápidamente, aunque la diferencia no es muy acusada.

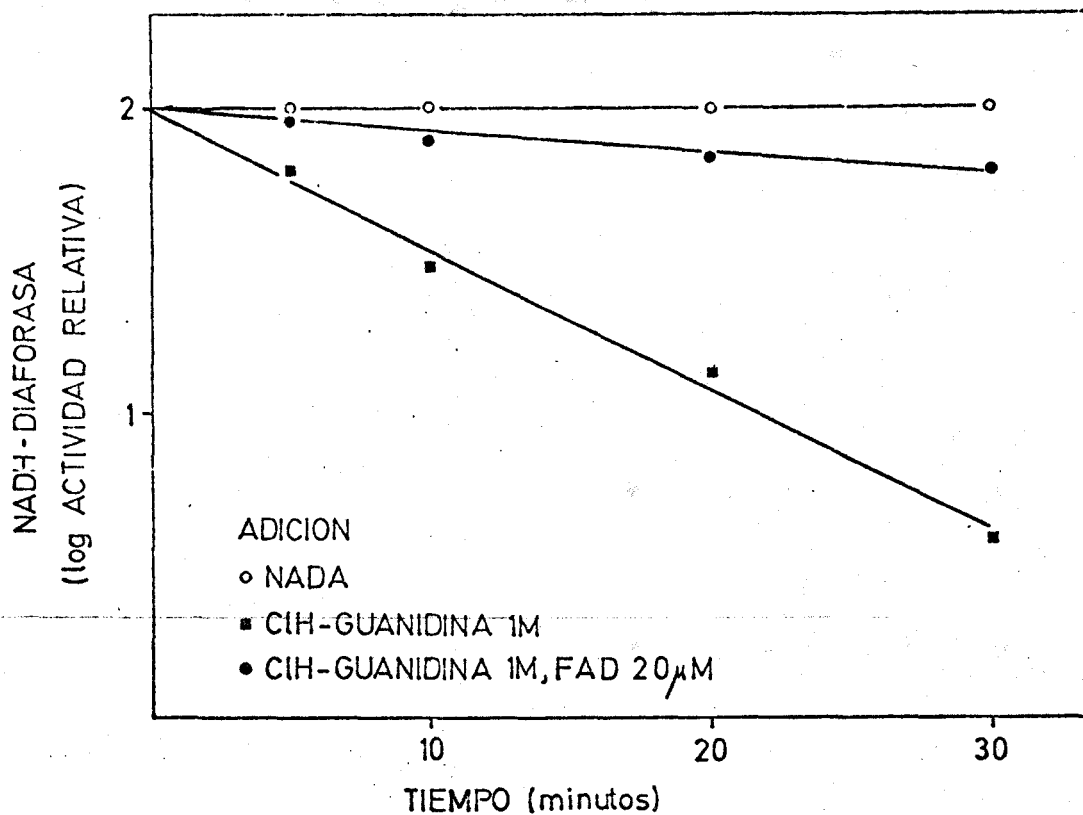


Figura 33.-Efecto del FAD sobre la inactivación de la NADH-diaforasa por clorhidrato de guanidina.

La nitrato reductasa (3mg/ml) se incubó a 25°C en presencia de fosfato potásico 0,2M (pH 7,5), NO_3K 10mM y EDTA 1mM, además de estos compuestos se incluyó clorhidrato de guanidina 1M (■) y clorhidrato de guanidina 1M más FAD 20µM (●). La actividad enzimática se determinó en alícuotas de las mezclas a los tiempos que se indican.

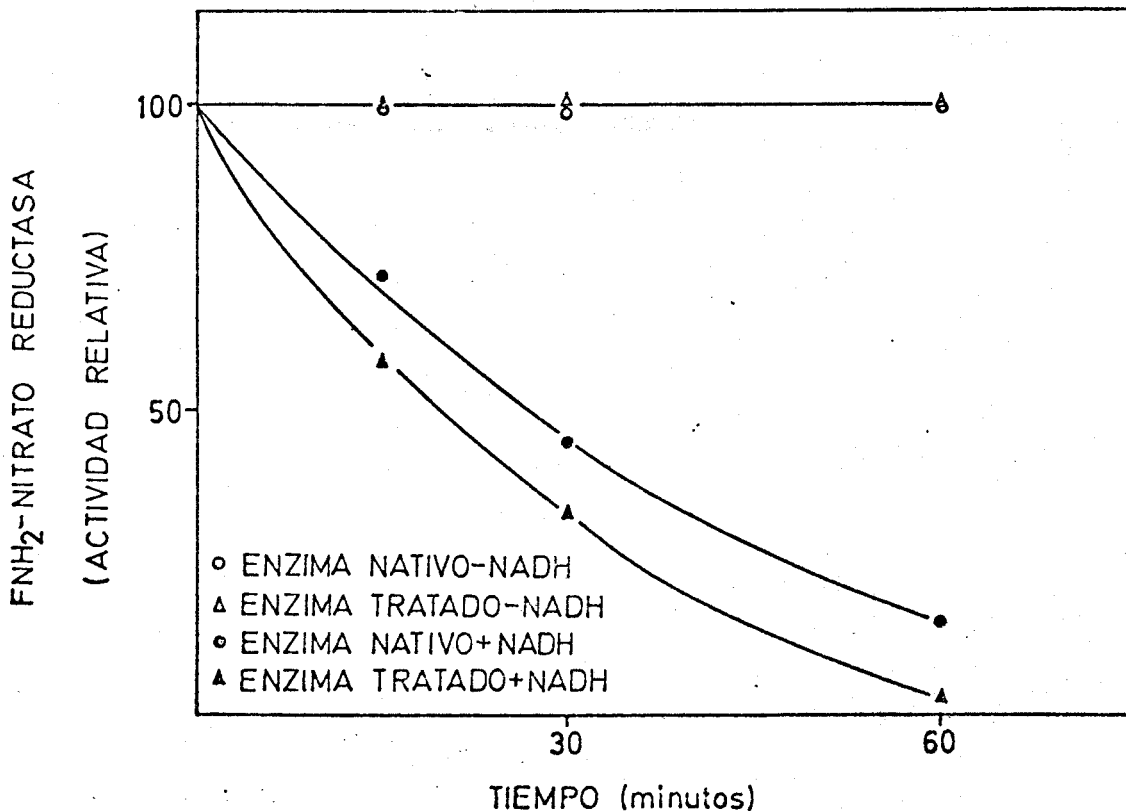


Figura 34.-Inactivación por NADH de un enzima tratado con clorhidrato de guanidina.

El enzima nativo (2mg prot./ml) (○,●) y el tratado con clorhidrato de guanidina (2mg prot./ml) (△,▲) se incubaron a 25°C con fosfato potásico 0,2M (pH 7,5), EDTA 1mM y FAD 20μM, en presencia (●,▲) y ausencia (○,△) de NADH 0,1mM. A los tiempos que se indican en la figura se determinó la actividad FNH₂-NO₃Rasa en alícuotas de las mezclas.

Para obtener el enzima tratado se incubó la nitrato reductasa (8mg/ml) en presencia de fosfato potásico 0,2M (pH 7,5), NO₃K 10mM, EDTA 1mM, FAD 20μM y clorhidrato de guanidina 1M. Al cabo de 20 minutos se eliminó el clorhidrato de guanidina por paso a través de Sephadex G-25. El enzima así obtenido presentaba unas actividades NADH-diaforasa y FNH₂-NO₃Rasa que eran el 100% y 60% respectivamente de los valores del enzima nativo.

3.6. Estudios de hibridación

Uno de los fines de este trabajo, era la hibridación de dos preparaciones a las que les faltase respectivamente una de las dos actividades parciales (NADH-diaforasa o FNH_2 -nitrato reductasa), para reconstruir así el complejo y la actividad total NADH-nitrato reductasa (79-83). En caso de conseguirse la hibridación, se demostraría la existencia en el enzima de subunidades con actividades parciales, que integradas en el complejo forman la actividad total NADH-nitrato reductasa.

Se utilizaron dos preparaciones, una tratada con SDS desprovista de actividad NADH-diaforasa, y otra tratada con urea y FAD carente de FNH_2 -nitrato reductasa. Ninguna de las dos preparaciones presentaba actividad NADH-nitrato reductasa. En las condiciones en las que se intentó la hibridación no se obtuvo actividad NADH-nitrato reductasa apreciable.

También fueron negativos los resultados de hibridación cuando la preparación que no tenía actividad NADH-diaforasa procedía de un enzima calentado en ausencia de FAD.

IV. DISCUSSION

En este trabajo se describe un nuevo método de purificación para la nitrato reductasa de espinaca. Las preparaciones obtenidas contienen el enzima purificado 450 veces con una actividad específica de 2,5 unidades internacionales. Estas preparaciones analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida presentan solo dos bandas de proteína.

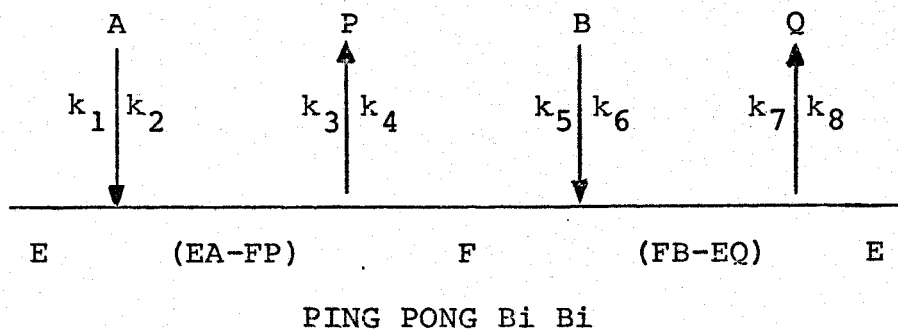
Este método de purificación es más sencillo que los anteriormente descritos (20,31), y la actividad específica de la preparación purificada es cuatro veces superior. Supone pues, un claro avance en la purificación de la nitrato reductasa de espinaca, y constituye un buen punto de partida para intentar obtener preparaciones homogéneas.

Eaglesham et al. (76), a partir del estudio de velocidades iniciales en el estado estacionario, han propuesto para la NADH-nitrato reductasa de espinaca un mecanismo cinético del tipo Ping Pong Bi Bi .

En el presente trabajo se ha hecho un estudio más detallado, que incluye el de la inhibición por productos.

El estudio de las velocidades iniciales en el estado estacionario (steady state) de la nitrato reductasa de espinaca, produjo una distribución de rectas paralelas para la representación de Lineweaver-Burk, tanto al estudiar la actividad NADH-nitrato reductasa como la NADH-citocromo c reductasa. En los dos casos, a partir de las representaciones secundarias (Figuras 6,7,15 y 16), se determinó el valor de K_a y K_b .

Estos resultados indican, que el mecanismo de estas dos reacciones catalizadas por el complejo nitrato reductasa ($\text{NADH} + \text{citocromo } \underline{c} \text{ oxidado} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{citocromo } \underline{c} \text{ reducido}$ y $\text{NADH} + \text{nitrato} \rightarrow \text{NAD}^+ + \text{nitrito}$) es del tipo Ping Pong Bi Bi, de acuerdo con los resultados obtenidos por Eaglesham et al. (76). En este tipo de mecanismo, el primer producto se libera del enzima antes de que se una el enzima al segundo sustrato, de acuerdo con el siguiente esquema:



En los estudios sobre el mecanismo cinético de la nitrato reductasa, anteriores a este trabajo, no se ha incluido el de las inhibiciones a que dan lugar los distintos productos liberados en la reacción enzimática. La inhibición por producto es una herramienta básica para el cinético, y de hecho es imprescindible para la determinación del mecanismo de una reacción enzimática. Para cada mecanismo considerado, se pueden predecir los tipos de inhibiciones a que dan lugar los distintos productos.

Generalmente, las intersecciones de las rectas, en la representación de Lineweaver-Burk, presentan un valor más alto en presencia de un inhibidor, cuando, el sustrato variable y el inhibidor se combinan con formas enzimáticas diferentes y la saturación del sustrato variable no puede eliminar la inhibición. Los valores de la pendiente aumentan, si el inhibidor se une a la misma forma enzimática que el sustrato variable.

La inhibición, según se afecte sólo la pendiente, la intersección o las dos, se conoce por el nombre de competitiva, incompetitiva o no competitiva, respectivamente.

Teniendo en cuenta las reglas anteriores, y analizando los esquemas de las Figuras 35 y 36, se pueden predecir los tipos de inhibición por producto característicos de los mecanismos Ping Pong Bi Bi e Iso Ping Pong Bi Bi (Tabla V).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio de las inhibiciones por productos de la actividad NADH-citocromo c reductasa, son los siguientes:

El NAD^+ frente al citocromo c como sustrato variable, da lugar a una inhibición competitiva (Fig. 10), que está de acuerdo con el mecanismo Ping Pong Bi Bi propuesto, ya que los dos compuestos se unen a la forma enzimática F (Fig. 35).

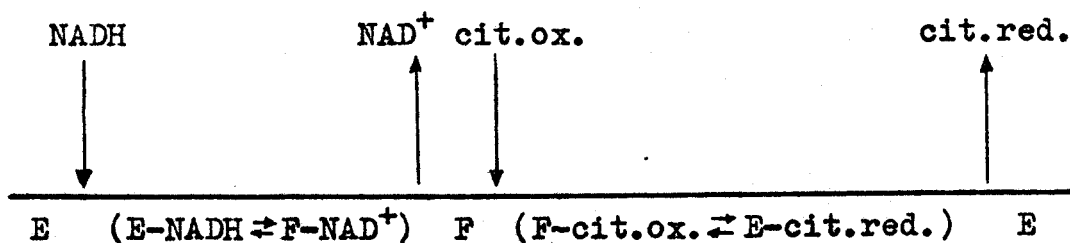
El NAD^+ frente a NADH como sustrato variable, da una inhibición que puede ser competitiva o no competitiva, dependiendo de la concentración de sustrato fijo citocromo c. Cuando la concentración de éste es saturante, diez veces la K_m , la inhibición es competitiva (Fig. 11); si la concentración no es saturante, la inhibición es no competitiva (Fig. 12). Estos resultados se explican si el

Tabla V

INHIBICIONES POR PRODUCTOS PREDICHO PARA LOS MECANISMOS
PING-PONG E ISOPING-PONG BI BI Y LAS OBSERVADAS

Sustrato variable	Producto inhibidor	Ping-Pong	Iso Ping-Pong	NADH-citoc. <u>c</u> reductasa	NADH-nitrato reductasa
NADH	NAD ⁺	NC	NC	NC	NC
NADH	nitrito ó cit. <u>c</u> red.	C	NC	NC	NC
nitrato ó cit. <u>c</u> ox.	NAD ⁺	C	C	C	-
nitrato ó cit. <u>c</u> ox.	nitrito ó cit. <u>c</u> red.	NC	NC	NC	NC

A. PING-PONG Bi Bi



B. ISO PING-PONG Bi Bi (Isomerización de E)

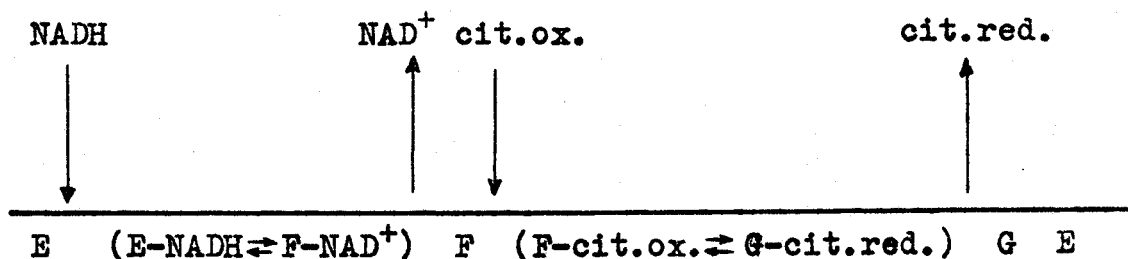
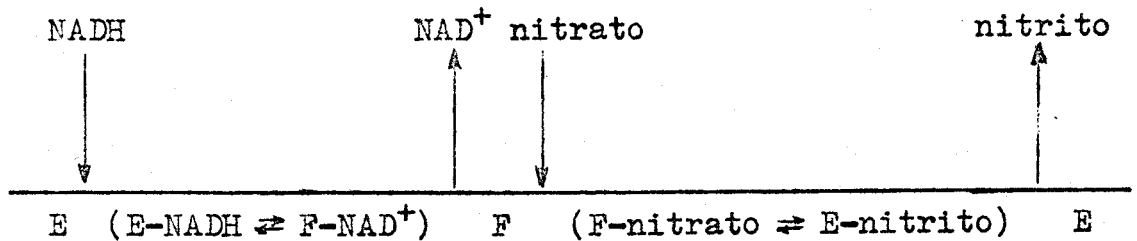


Figura 35. Mecanismos cinéticos propuestos para la actividad NADH-citocromo c reductasa.

A. PING-PONG Bi Bi



B. ISO PING-PONG Bi Bi (Isomerización de E)

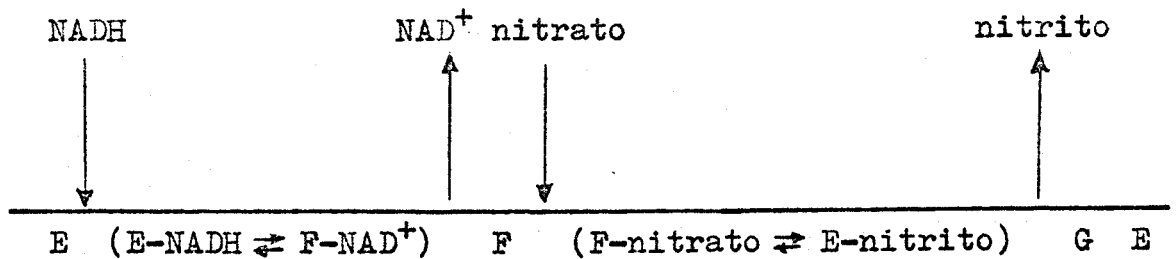


Figura 36. Mecanismos cinéticos propuestos para la actividad NADH-nitrato reductasa.

producto NAD^{\ddagger} se une tanto a la forma F como a la E. Cuando la concentración de citocromo c oxidado es suficientemente alta para que toda la forma F sea convertida en forma FB, el NAD^{\ddagger} solo puede unirse a la forma E, siendo la inhibición competitiva. Si la concentración de citocromo c oxidado no es suficientemente alta, haciendo que exista una proporción apreciable de forma F, el NAD^{\ddagger} se une tanto a F como a E, dando lugar a una inhibición aparentemente no competitiva.

El citocromo c reducido frente a citocromo c oxidado como sustrato variable, da inhibición no competitiva (Fig. 9), que es la esperada para el mecanismo Ping Pong Bi Bi.

Frente a NADH como sustrato variable, la inhibición por citocromo c reducido es no competitiva (Fig. 8), lo cual es contrario a lo esperado para el mecanismo Ping Pong Bi Bi, ya que tanto uno como otro se unen a la forma enzimática E en el esquema propuesto. Sin embargo, se explica admitiendo la existencia de una nueva forma enzimática G a la que se une el citocromo c reducido, la forma G es una forma enzimática diferente de la forma E.

En el caso de la NADH-nitrato reductasa, los resultados fueron semejantes (Tabla V) a los obtenidos para la NADH-citocromo c reductasa.

La inhibición por NAD^+ frente a nitrato como sustrato variable, no se pudo estudiar debido a la contaminación en nitrato que lleva las preparaciones comerciales de NAD^+ .

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de las velocidades iniciales para concentraciones variables de los sustratos, con una distribución de rectas paralelas características del mecanismo Ping Pong, y los tipos de inhibiciones encontrados usando los distintos productos como inhibidores (Tabla V), podemos concluir que el mecanismo cinético para las dos actividades estudiadas y catalizadas por el complejo nitrato reductasa de espinaca, se ajusta a un mecanismo del tipo Iso Ping Pong Bi Bi con isomerización de la forma enzimática E (Figuras 35 y 36), y no al mecanismo Ping Pong Bi Bi propuesto por Eaglesham et al. (76).

Los estudios realizados no permiten distinguir entre el mecanismo propuesto y otro del mismo tipo, en el

cual es el nitrato, o el citocromo c oxidado, el que se une a la forma E del enzima en lugar del NADH.

Los agentes desnaturalizantes utilizados (pH ácido y básico, calor, urea, dodecil sulfato sódico, clorhidrato de guanidina), afectan al complejo enzimático nitrato reductasa, produciendo pérdida de las actividades enzimáticas.

En algunas preparaciones (por ejemplo, las tratadas a pH ácido o con urea) parte de la actividad se recupera al suspender el tratamiento. La reactivación es tanto más completa cuanto menor sea el grado de inactivación obtenido. La reactivación puede deberse, bien a una simple reasociación de subunidades, o a una reorganización de la estructura tridimensional del complejo.

El FAD tiene un efecto estabilizador sobre el complejo nitrato reductasa, protegiendo de modo especial la actividad NADH-diaforasa.

La inactivación selectiva por algunos agentes desnaturizantes utilizados de una de las actividades parciales, NADH-diaforasa o FNH_2 -nitrato reductasa, inducen a pensar que estas actividades están localizadas en porciones distintas del complejo, de acuerdo con los resultados obtenidos con inhibidores y otros tratamientos (19,36,46, 51,11,35,20 y 26).

El FAD juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura y función de la nitrato reductasa. Como se dijo en la Introducción, la nitrato reductasa de espinaca es una flavoproteína (19,21). Además, después de ciertos tratamientos la actividad diaforásica y la inactivación por NAD(P)H requieren FAD exógeno (48). Los requerimientos en FAD de estos dos procesos son diferentes, lo cual indica que el FAD actúa de diferente forma en los dos casos. El FAD protege al complejo de la inactivación térmica (20), y los resultados presentados en este trabajo muestran cómo también ejerce un efecto protector frente a otros agentes desnaturizantes, lo cual indica su importancia en la estabilización de la estructura tridimensional del complejo.

A semejanza de la modificación por pHMB (46), el tratamiento con SDS de la nitrato reductasa produce preparaciones carentes de actividad diaforásica, las cuales conservan la capacidad de inactivación por piridín nucleótidos reducidos de la FNH_2 -nitrato reductasa. Estos resultados parecen indicar que la inactivación por NAD(P)H es independiente de la actividad NADH diaforasa.

En algunos tratamientos con agentes desnaturizantes se observa un pequeño aumento en el grado de inactivación por NADH, lo cual se puede deber a que ciertos grupos se hacen más fácilmente accesibles a la reducción.

Con el fin de estudiar la estructura cuaternaria del complejo nitrato reductasa, preparaciones tratadas con ciertos agentes desnaturizantes se intentaron separar en fracciones que presentaran distintas actividades enzimáticas. El tratamiento con urea y DTE produjo preparaciones con baja actividad FNH_2 -nitrato reductasa. En estas preparaciones pudo separarse una fracción con sólo actividad NADH-diaforasa de otra fracción de peso molecular más alto que presentaba actividad NADH-nitrato reductasa, la cual corres -

ponde al complejo total de la nitrato reductasa. Estos resultados parecen indicar una disociación del complejo en subunidades, una de las cuales retiene la actividad parcial NADH-diaforasa.

Los experimentos de hibridación utilizando preparaciones que presentaban una sola de las actividades parciales, no permitieron reconstruir la actividad NADH-nitrato reductasa, lo cual habría demostrado la localización de las actividades parciales en subunidades diferentes.

V. CONCLUSIONES

1. El procedimiento de purificación que se describe, permite obtener preparaciones con una actividad específica de NADH-nitrato reductasa de 2,5 unidades internacionales y una relación entre las actividades NADH-nitrato reductasa y FNH_2 -nitrato reductasa de 0,8.
2. El pH óptimo, a concentraciones saturantes de los sustratos, es 7,5 para las tres actividades del complejo.
3. La NADH-nitrato reductasa y la FNH_2 -nitrato reductasa tienen una energía de activación de 10,98 Kcal/mol.
4. La actividad NADH-nitrato reductasa presenta un mecanismo cinético del tipo Iso Ping Pong Bi Bi, con isomerización de la forma enzimática a la que se une el NADH.
5. La actividad NADH-citocromo c reductasa presenta un mecanismo cinético del tipo Iso Ping Pong Bi Bi, con isomerización de la forma enzimática a la que se une el NADH.
6. La incubación a pH ácido o básico (3,5 y 10,5) afecta al complejo nitrato reductasa produciendo pérdida de las tres actividades enzimáticas.

7. La inactivación de la NADH-nitrato reductasa por tratamiento a pH ácido (3,5 y 4,5) es reversible, y al reajustar el pH a 7,5 se recupera gran parte de la actividad original.
8. El calentamiento entre 25 y 50°C durante 20 minutos produce pérdida selectiva de la actividad NADH-diaforasa.
9. La incubación con urea (2 a 4 M) en presencia de FAD (20 μ M), afecta al complejo nitrato reductasa produciendo la pérdida de las actividades NADH-nitrato reductasa y FNH₂-nitrato reductasa, sin que se afecte la NADH-diaforasa.
10. La inactivación por urea (1 a 4 M) de la NADH-nitrato reductasa es reversible. Al disminuir la concentración de urea por dilución se recupera parcialmente la actividad enzimática.
11. La incubación con dodecil sulfato sódico al 0,03% produce pérdida de las tres actividades enzimáticas siendo la FNH₂-nitrato reductasa la menos afectada.

12. La incubación con clorhidrato de guanidina 1 M en presencia de FAD 20 μM , produce la pérdida de las actividades NADH-nitrato reductasa y FNH_2 -nitrato reductasa sin que se afecte la NADH-diaforasa.
13. La presencia de FAD 20 μM estabiliza al complejo nitrato reductasa protegiendo a la actividad diaforasa de la inactivación con ciertos agentes desnaturizantes: pH ácido y básico, calor, urea y clorhidrato de guanidina.
14. Existen indicios de que el tratamiento con urea y DTE produce la disociación en subunidades del complejo nitrato reductasa.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. PANEQUE, A., APARICIO, P.J., CARDENAS, J., VEGA, J.M. y LOSADA, M. FEBS Letters, 3, 57 (1969).
2. LOSADA, M., HERRERA, J., MALDONADO, J.M. y PANEQUE, A. Plant Sci. Letters, 1, 31 (1973).
3. MALDONADO, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 27 (1973).
4. NASON, A. Bacteriol. Rev., 26, 16 (1962).
5. NASON, A. y EVANS, H.J. J. Biol. Chem., 202, 655 (1953).
6. NASON, A. The Enzymes. Academic Press, Nueva York, (1972) vol. 7 pag. 587.
7. LOSADA, M. La Fotosíntesis del nitrógeno nítrico. Real Academia de Ciencias, Madrid 1972.
8. MCKEE, H.S. Nitrogen Metabolism in Plants. Clarendon Press, Oxford, 1962.
9. CARDENAS, J., BAREA, J.L., RIVAS, J. y MORENO, C.G. FEBS Letters, 23, 131 (1972).
10. SILVER, W.S. J. Bacteriol., 73, 241 (1957).
11. VEGA, J.M., HERRERA, J., RELIMPIO, A.M. y APARICIO, P.J. Physiol. Veg., 10, 637 (1972).

12. CARDENAS, J., PINEDA, F.D., DE LA ROSA, F.F., BAREA, J.L. y RIVAS, J. *Anales de Edafología y Agrobiología*, 22, 815 (1973).
13. CARDENAS, J., RIVAS, J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. *Arch. Mikrobiol.*, 79, 367 (1971).
14. PICHINOTY, F. y METENIER, G. *Annales de L'Institut Pasteur*, III, 282 (1966).
15. PANEQUE, A., VEGA, J.M., CARDENAS, J., HERRERA, J., APARICIO, P.J. y LOSADA, M. *Plant Cell. Physiol.*, 13, 175 (1972).
16. HEIMER, Y.M., WRAY, J.L. y FILNER, P. *Plant Physiol.*, 44, 1197 (1969).
17. WRAY, J.L. y FILNER, P. *Biochem. J.*, 119, 715 (1970).
18. HAGEMAN, R.H. y HUCKLESBY, D.P. *Methods in Enzymology*, Academic Press, N.Y. (1971) vol. 23, pag. 491.
19. EVANS, H.J. y NASON, A. *Plant Physiol.*, 28, 233 (1953).
20. ZUMFT, W.G., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. *FEBS Letters*, 9, 157 (1970).
21. NICHOLAS, D.J.D. y NASON, A. *J. Biol. Chem.*, 211, 183 (1954).

22. PANEQUE, A., y LOSADA, M. *Biochim.Biophys.Acta*, 128, 202 (1966).
23. PANEQUE, A., APARICIO, P.J., CATALINA, L. y LOSADA, M. *Biochim.Biophys.Acta*, 162, 149 (1968).
24. NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J. *Plant Cell. Physiol.*, 12, 465 (1971).
25. APARICIO, P.J., CARDENAS, J., ZUMFT, W.G., VEGA, J.M., HERRERA, J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. *Phytochem.*, 10, 1487 (1971).
26. LOSADA, M., APARICIO, P.J. y PANEQUE, A. *Progress in Photosynthesis Research*, vol. III, ed. por H. Metzner, Institut fur Chemische Pflanzenphysiol., Tubingen, 1969, pag. 1504.
27. NOTTON, B.A. y HEWITT, E.J. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 44, 702 (1971).
28. VEGA, J.M., HERRERA, J., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. *Plant Physiol.*, 48, 294 (1971).
29. MCGREGOR, C.H., SCHNAITMAN, C.A., NORMANSELL, D.E. y HUDGINS, M.G. *J. Biol. Chem.*, 249, 5321 (1974).
30. ROSSO, J.P., FORGET, P. y PICHINOTY, F. *Biochim.Biophys. Acta*, 321, 443 (1973).

31. PANEQUE, A., DEL CAMPO, F.F., RAMIREZ, J.M. y LOSADA, M. *Biochim.Biophys.Acta*, 109, 79 (1965).
32. APARICIO, P.J. Tesis Doctoral, Anales de la Universidad Hispalense, Sevilla, 1971.
33. BEEVERS, L. y HAGEMAN, R.H. *Ann.Rew. Plant. Physiol.*, 20, 495 (1969).
34. KESSLER, E. y OESTERHELD, H. *Nature*, 228, 287 (1970).
35. RELIMPIO, A.M., APARICIO, P.J., PANEQUE, A. y LOSADA, M. *FEBS Letters*, 17, 226 (1971).
36. HEWITT, J. y NICHOLAS, D.J.D. *Modern Methods of Plants Analysis*, Springer Verlag, Berlin, 1964 vol. 7, pag.67.
37. GARRET, R.H. y NASON, A. *J. Biol. Chem.*, 244, 2870 (1969).
38. LOSADA, M., PANEQUE, A., APARICIO, P.J., VEGA, J.M., CARDENAS, J., y HERRERA, J. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 38, 1009 (1970).
39. HERRERA, J., PANEQUE, A., MALDONADO, J.M., BAREA, J.L. y LOSADA, M. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 48, 996 (1972).
40. LOSADA, M., y ARNON, D.I. *Metabolic Inhibitors*, vol. II, ed. por Hochster, R.M. y Quastel, J.H. Academic Press, N.Y., 1963, pag. 559.

41. DOWNEY, R.J. J.Bacteriol., 105, 759 (1971).
42. MORENO, C.G., APARICIO, P.J., PALACIAN, E. y LOSADA, M. FEBS Letters, 26, 11 (1972).
43. SYRET, P.J. y HIPKIN, C.R. Planta III, 57 (1973).
44. MORENO, C.G. y PALACIAN, E. Arch. of Biochem. and Biophys., 160, 269 (1974).
45. PALACIAN, E., DE LA ROSA, F.F., CASTILLO, F. y MORENO, C.G. Arch. Biochem.Biophys., 161, 441 (1974).
46. CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F. y PALACIAN, E. Biochem. Biophys.Res.Comm., 64, 546 (1975).
47. CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F., NOVALES, M.A. y PALACIAN, E. VI Congreso de la SEB, Sevilla, 1975, Resúmenes 113.
48. CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F., CALERO, F. y PALACIAN, E. (en vías de publicación).
49. MORENO, C.G. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 1973.
50. ZUMFT, W.G., PANEQUE, A., APARICIO, P.J. y LOSADA, M. Biochem.Biophys.Res.Comm., 36, 980 (1969).
51. LOSADA, M. en Fischer, E.H., Krebs, E.G., Neurath, H. y Stadtman, E.R., Metabolic Interconversion of Enzymes, 1973, Springer Verlag, Berlin, 1974 pag. 255.

52. MORENO, C.G., CASTILLO, F., DE LA ROSA, F.F. y PALACIAN, E. XI Jornadas Bioquímicas Latinas, Salamanca, 1973, Resúmenes d. 98.
53. NASON, A., ANTONIE, A.D., KETCHUM, P.A., FRAZIER, W.A. y LEE, D.K. Proc.Nat.Acad.Sci. (USA) 65, 137 (1970).
54. KETCHUM, P.A., CAMBIER, H.Y., FRAZIER, W.A., MADANSKY, C.H. y NASON, A. Proc. Nat.Acad.Sci. (USA), 66, 1016(1970).
55. NASON, A., LEE, K.Y., PAN, S.S., KETCHUM, P.A., LAMBERTI, A. y DEVRIES, J. Proc.Nat.Acad.Sci.(USA), 68, 3242 (1971).
56. TANFORD, C. Adv. Protein Chem., 23, 121 (1968).
57. OKUNUKI, K. Adv. in Enzymology, 23, 29 (1961).
58. FISH, W.W., KENNETH, G.M. y TANFORD, C. J. Biol.Chem., 244, 4989 (1969).
59. SCHACHMAN, H.K. y EDELSTEIN, S.J. Biochemistry, 5, 2681 (1966).
60. KAWAHARA, K. y TANFORD, C. Biochemistry, 5, 1578 (1966).
61. MEANS, G.E. y FEENEY, R.E. Chemical modifications of proteins, Holden-day, San Francisco, 1971.
62. ELDJARN, L. y PIHL, A. J.Biol.Chem., 225, 449 (1957).

63. CLELAND, W.W. *Biochemistry*, 3, 480 (1964).
64. ANFINSEN, C.B. y HABER, E. *J.Biol.Chem.*, 236, 1361 (1961).
65. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.S. *J.Biol.Chem.*, 193, 265 (1951).
66. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W. *Biochem. Z.*, 310, 384 (1941).
67. DAWES, E.A. *Comprehensive Biochemistry*, ed. por Florkin, M. y Stotz, E.H. 1964, vol. 12, pag. 89.
68. CLELAND, W.W. *The Enzymes*, Tercera edición, ed. por Boyer, P.D., 1970, vol. 2, pag. 1.
69. FAN, L.L. y MASTERS, B.S. *Arch. Biochem.Biophys.*, 165, 665 (1974).
70. CLELAND, W.W. *Biochim.Biophys.Acta*, 67, 104 (1963).
71. CLELAND, W.W. *Biochim.Biophys.Acta*, 67, 173 (1963).
72. CLELAND, W.W. *Ann.Rev.Biochem.*, 36, 77 (1967).
73. CLELAND, W.W. *Biochim.Biophys.Acta*, 67, 188 (1963).
74. CLELAND, W.W., *Adv. in Enzymology*, 29, 1 (1967).
75. CLELAND, W.W. *Nature*, 198, 463 (1963).

76. EAGLESHAM, A.R.J. y HEWITT, E.J. Proc.Biochem.Soc., 122, 18p (1971).
77. DEAL, W.C., RUTTER, W.J. y VAN HOLDE, Biochemistry, 2, 246 (1963).
78. STELLWAGEN, E. y SCHACHMAN, H.K. Biochemistry, 1, 1056 (1962).
79. PENHOET, E., KOCHMAN, M., VALENTINE, R. y RUTTER, W.J. Biochemistry, 6, 2940 (1967).
80. CHANCEUX, J.P., GERHART, J.C. y SCHACHMAN, H.K. Biochemistry, 7, 531 (1968).
81. MEIGHEN, E.A. y SCHACHMAN, H.K. Biochemistry, 9, 1163 (1970).
82. MEICHEN, E.A. y SCHACHMAN, H.K. Biochemistry, 9, 1177 (1970).
83. MEICHEN, E.A., PIGIET, V. y SCHACHMAN, H.K. Proc.Nat. Acad.Sci., 65, 234 (1970).
84. KETCHUM, P.A. y DOWNEY, R.J. Biochim.Biophys.Acta, 385, 354 (1975).
85. LEE, K.Y., PAN, S.S., ERICKSON, R. y NASON, A. J.Biol. Chem., 249, 3941 (1974).

86. LEE, K.Y., ERICKSON, R., PAN, S.S., JONES, G., MAY, F.
y NASON, A. J.Biol.Chem., 249, 3953 (1974).
87. APARICIO, P.J., PANEQUE, A., RODRIGUEZ-LOPEZ, M., y
LOSADA, M. Anal.Aula Dei, 10, 744 (1969).
88. GUERRERO, M.G., VEGA, J.M., LEADBETTER, E. y LOSADA, M.
Arch. Mikrobiol., 91, 287 (1973).

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
D. FRANCISCO FERNANDO DE LA ROSA ACOSTA
titulada "~~Niños reductores de expresiones: Mecanismos
cinebicos y efectos de agentes desnaturalizantes~~"
acordó otorgarle la calificación de ~~Cobos obente~~
"cum laude"

Sevilla, 22 de ~~Octubre~~ 1975

El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,



El Presidente,



El Secretario,

