

Angel de la Torre Casas

PURIFICACION, CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS Y ESPECIFICIDAD BIOQUIMICA DE LA FERREDOXINA DE HOJAS DE LECHUGA

TESIS DOCTORALES DE LA
UNIVERSIDAD DE GRANADA

151

Dupl. R. 20857

R.32.411

4/101

FACULTAD DE CIENCIAS

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento <u>613519554</u>
Nº Copia <u>1549041.5</u>

**PURIFICACION, CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS Y ESPECIFICIDAD
BIOQUIMICA DE LA FERREDOXINA DE HOJAS DE LECHUGA**

ANGEL DE LA TORRE CASAS

Tesis doctoral



UNIVERSIDAD DE GRANADA

1977



Tesis doctoral dirigida por el Dr. D. Julio López Gorgé, Investigador Científico del C.S.I.C. y Jefe de la Sección de Bioquímica de la Estación Experimental del Zaidin. Fue leída el día 15 de Enero de 1977, ante el tribunal formado por los Profesores: Santos Ruiz; Mayor Zaragoza; Recalde Martínez; Sánchez de Medina Contreras y García Peregrin. Obtuvo la calificación de sobresaliente "cum laude".

El trabajo que presentamos ha -
sido realizado en el LABORATORIO DE
LA SECCION DE BIOQUIMICA DE LA ESTA-
CION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN durante
los cursos académicos 1972-73, 1973-
74, 1974-75 y 1975-76.

INDICE

	<u>Página</u>
<u>INTRODUCCION; ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION</u>	21
<u>PLAN DE TRABAJO</u>	51
<u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	55
I. PREPARACION DE FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.	57
1. <u>Material biológico de partida.</u>	57
1.1. Material utilizado: preparación previa.	57
1.2. Preparación de extractos crudos.	58
1.2.1. Metódica.	58
1.2.2. Reactivos.	58
2. <u>Tests de contenido proteico, pureza y operatividad.</u>	59
2.1. Determinación del contenido proteico.	59
2.1.1. Método de Lowry y col.	59
2.1.1.1. Curva standard de albúmina sérica bovina.	59
2.1.1.2. Metódica.	59
2.1.1.3. Reactivos.	61
2.1.2. Absorción específica a 422 nm.	62
2.2. Test de pureza por razón de absorbancias visible/ultravioleta.	62
2.3. Test de homogeneidad por electroforesis en gel de poliacrilamida.	63

	<u>Página</u>
2.3.1. Metódica.	63
2.3.2. Reactivos.	65
2.4. Operatividad según el test de la ferredoxin=NADP-reductasa.	66
2.4.1. Metódica.	67
2.4.2. Reactivos.	69
.	
← A. Suspensión de cloroplastos lisados.	70
A.1. Metódica.	70
A.2. Reactivos.	72
A.3. Determinación de clorofila.	72
.	
3. <u>Purificación.</u>	73
3.1. Método.	74
3.1.1. Precipitación acetónica de los extractos crudos.	75
3.1.2. Adsorción sobre DEAE-celulosa.	76
3.1.3. Cromatografía sobre DEAE-celulosa.	77
3.1.4. Concentración sobre DEAE-celulosa.	78
3.1.5. Filtración por Sephadex G-75.	78
3.1.6. Cristalización.	79
3.2. Reactivos.	82
II. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LAS FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.	86
1. <u>Espectros de absorción visible/UV.</u>	86
2. <u>Coefficiente de absorción molar.</u>	87

	<u>Página</u>
2.1. Metodica.	88
3. <u>Determinación del punto isoeléctrico.</u>	89
3.1. Metodica.	91
3.2. Reactivos.	93
4. <u>Potencial de óxido-reducción.</u>	94
4.1. Metodica.	99
4.1.1. Determinación de la razón A_{740}/A_{422} del MV reducido.	99
4.1.2. Cálculo de la diferencia de absorciones a 422 nm de las formas oxd. y red., por unidad de absorción de la forma oxd. de ferredoxina.	101
4.1.3. Determinación del potencial redox biológico normal.	102
4.2. Reactivos.	103
5. <u>Determinación del peso molecular.</u>	104
5.1. Metodica.	106
5.1.1. Formación del gradiente.	106
5.1.2. Centrifugación.	107
5.1.3. Elución.	109
5.2. Reactivos.	110
6. <u>Composición en aminoácidos.</u>	110
6.1. Hidrolisis ácida.	111
6.2. Oxidación perfórmica.	112
6.3. Análisis cromatográfico de aminoácidos.	113
6.4. Análisis cromatográfico del ácido cisteico.	116
6.5. Cálculo del peso molecular atendiendo a la composición en aminoácidos.	117
6.6. Reactivos.	118

	<u>Página</u>
7. <u>Contenido en hierro.</u>	122
7.1. Curva patrón de hierro.	124
7.2. Mineralización de la muestra y determinación del hierro.	124
7.3. Cálculo del peso molecular por contenido molar en hierro.	125
7.4. Reactivos.	125
8. <u>Determinación de azufre inorgánico como S²⁻.</u>	126
8.1. Curva patrón de sulfuro.	126
8.2. Metodica.	128
8.3. Reactivos.	129
9. <u>Determinación de grupos -SH titulables.</u>	130
9.1. Metodica.	130
9.2. Reactivos.	
10. <u>Determinación por accesibilidad de los grupos -SH, por cromatografía de covalencia.</u>	132
10.1. Metodica.	133
10.1.1. Preparación de la columna.	133
10.1.2. Preparación de las muestras.	134
10.1.3. Cromatografía.	134
10.2. Reactivos.	135
III. ESPECIFICIDAD BIOQUIMICA DE LAS FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.	135
1. <u>Operatividad frente a la nitrito reductasa.</u>	135
1.1. Determinación de nitrito. Curva patrón de nitrito.	136
1.1.1. Metodica.	138
1.1.2. Reactivos.	139

	<u>Página</u>
1.2. Test de la nitrito reductasa ferredoxin- -dependiente.	140
1.2.1. Metodica.	140
1.2.2. Reactivos. A	141
.	
← A. Obtención del preparado enzimático, de nitrito re- ductasa de espinaca.	141
A.1. Determinación de actividad de nitrito reducta sa MV-dependiente.	141
A.2. Metodica de purificación.	142
A.2.1. Obtención de extractos crudos.	142
A.2.2. Precipitación acetónica.	143
A.2.3. Eliminación de la ferredoxina.	144
A.2.4. Cromatografía sobre DEAE-celulosa.	144
A.3. Reactivos.	145
.	
2. <u>Operatividad frente al sistema fructosa-1,6-</u> <u>difosfatasa.</u>	146
2.1. Determinación de fósforo inorgánico. Cur va patrón de fosfatos.	147
2.1.1. Metodica.	147
2.1.2. Reactivos.	149
2.2. Ensayo de actividad FDPasa ferredoxina- -dependiente.	149
2.2.1. Metodica.	150
2.2.2. Reactivos. A, B y C	152
.	

	<u>Página</u>
↙ A. Obtención de preparados purificados de FDPasa.	153
A.1. Metódica.	153
A.1.1. Preparación de extractos crudos de hojas.	153
A.1.2. Precipitación térmica.	154
A.1.3. Fraccionamiento con sulfato amónico.	154
A.1.4. Filtración por Sephadex G-100.	155
A.1.5. Filtración por Sephadex G-200.	155
A.1.6. Cromatografía sobre DEAE-celulosa.	155
A.2. Reactivos.	156
A.3. Dosificación de la actividad FDPasa.	156
A.3.1. Metódica.	157
A.3.2. Reactivos.	158
↙ B. Obtención de preparados purificados de "factor proteico".	158
B.1. Metódica.	159
B.1.1. Preparación de extractos crudos.	159
B.1.2. Precipitación a pH 4.5.	159
B.1.3. Precipitación acetónica.	159
B.2. Reactivos.	160
B.3. Test de operatividad del "factor proteico".	161
B.3.1. Metódica.	161
B.3.2. Reactivos.	162
↙ C. Preparación de suspensión de fragmentos de cloro- plastos.	162

.

	<u>Página</u>
3. <u>Operatividad frente a la ferredoxin-NADP-re-</u> <u>ductasa.</u>	163
RESULTADOS.	165
I. PREPARACION DE FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.	167
II. CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LAS FERREDOXI- NAS DE ESPINACA Y LECHUGA.	169
1 y 2. <u>Espectros de absorción visible-UV. Coefi-</u> <u>cientes de absorción molar.</u>	169
3. <u>Determinación del punto isoeléctrico.</u>	170
4. <u>Potencial de óxido-reducción.</u>	171
5. <u>Determinación del peso molecular.</u>	172
6. <u>Composición en aminoácidos.</u>	173
7 y 8. <u>Contenido en hierro. Determinación de azu-</u> <u>fre inorgánico como S²⁻.</u>	174
9. <u>Determinación de grupos -SH titulables.</u>	175
10. <u>Accesibilidad de los grupos -SH por cromatografía de covalencia.</u>	176
III. ESPECIFICIDAD BIOQUIMICA DE LAS FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.	176
DISCUSION.	207
CONCLUSIONES.	247
BIBLIOGRAFIA.	251

WHAT'S FERREDOXIN?

A PROTEIN. AN ELECTRON CARRIER WITH A
VERY LOW REDOX POTENTIAL.

de la novela "The Couples", J. Up-
dike (A. Knopf Ed., New York, 1966).

INTRODUCCION, ANTECEDENTES
Y JUSTIFICACION

Las ferredoxinas constituyen una parcela del más complejo campo de las sulfoferroproteínas, transcripción castellana del ya clásico concepto anglosajón de "iron-sulfur-proteins". Es te se aplica restrictivamente a aquéllas ferroproteínas en las que el azufre se encuentra directamente unido al hierro, sin que éste aparezca ligado a ningún otro tipo de átomo. Esto excluye al complejo grupo de las porfirinas, de desarrollo muy anterior, ya que mientras la evolución del campo de los hemo y hemoproteínas puede contabilizarse en términos casi de centurias, el de las "sulfoferroproteínas" data apenas de las dos últimas décadas y, desde luego, cae dentro de una sola generación de investigadores.

El progresivo hallazgo de que este tipo de compuestos tiene una distribución general en los seres vivos, en los que juegan como transportadores de electrones un papel clave en diferentes procesos determinantes de la vida -fotosíntesis, fijación de nitrógeno, transporte electrónico de orgánulos subcelulares, etc.-, ha justificado su consideración como campo de investigación con personalidad propia, comparable al de las hemo y flavoproteínas.

Al igual que sucedió en el campo de las ubiquinonas, cabe preguntarse cómo compuestos tan básicos en las oxidaciones biológicas permanecieron indetectados hasta prácticamente la mi tad de esta centuria. Existen una serie de razones que conduje- ron a este estado de cosas.

En primer lugar, una de las primitivas armas de la química biológica fué la espectrofotometría y, en este sentido, las sulfoferroproteínas con sus desvaidas tonalidades rojo=par- duzas no son comparables a las coloraciones rojo=brillantes de las hemo-proteínas. Y no sólo los máximos espectrales son menos pronunciados cuando se consideran en relación molar o por átomo de hierro de la molécula, sino que además las bandas de absor- ción son más anchas, menos definidas y, en tal sentido, parcial- mente solapadas por las correspondientes a los compuestos flaví- nicos y por las colas de absorción de los hemo.

En segundo lugar, el gran desarrollo de la química biológica estructural del pasado siglo estuvo asentado en dos = postulados clásicos de la química orgánica: análisis y química degradativa. Estos principios fueron fácilmente aplicables a mo- léculas biológicas ~~re~~relativamente estables, como vitaminas, = hormonas, etc., pero fracasaron en poner de manifiesto la exis- tencia de compuestos inestables, entre ellos las proteínas con azufre e hierro, en los que la agrupación Fe-S se encuentra sus- tentada por débiles enlaces en el interior de la matriz protei- ca. Sólo el advenimiento de técnicas no destructivas, y no por ello menos específicas y sensibles, como la resonancia magnéti- ca nuclear (NMR), la resonancia electrónica paramagnética (EPR), la espectroscopía Mössbauer, etc., pudo abrir el paso al conoci- miento de este tipo de compuestos.

Y una tercera razón, quizás la más importante, ha sido la baja concentración que presentan las sulfoferroproteínas

en los materiales biológicos en relación a otros compuestos que contienen hierro. Si exceptuamos algunas entidades moleculares que, o contienen hierro ligado de una forma extremadamente lábil o presentan un bajo peso molecular, nuestro conocimiento sobre las distintas familias moleculares con hierro, y su función biológica, queda resumido en la Tabla I.

TABLA I

Formas conocidas de hierro en los sistemas biológicos (1):

<u>Formas de almacenaje y transporte de Fe</u>	<u>Transportadores de oxígeno</u>	<u>Enzimas y transportadores de electrones</u>
Ferritina	Hemoglobinas	Enzimas con grupos hemo
Hemosiderina	Mioglobinas	Oxigenasas
Transferrinas (siderofilinas)	Hemeritrina	Sulfoferroproteínas
Sideraminas		
Enterobactinas		

No existen datos en el reino vegetal sobre el porcentaje que, en relación al contenido total de hierro, corresponde a las proteínas con azufre e hierro. En mamíferos, y como conclusión colateral de los datos suministrados por Drabkin (2), se puede decir que aproximadamente el 1% del contenido global en hierro se encuentra bajo forma de sulfoferroproteínas, las cuales, por otro lado, constituyen una fracción desconocida en relación al contenido total de hierro no hemínico. Este bajo porcentaje representa en valores absolutos cantidades inferiores al error de los métodos analíticos habitualmente utilizados en la determinación de hierro, lo que explica que no se tomasen en consideración.

Los primeros datos sobre la existencia de las sulfo-

Ferroproteínas procedieron de trabajos efectuados en tejidos en los que el contenido de hemoproteínas y formas proteicas de almacenamiento de hierro -las dos entidades férricas normalmente mayoritarias- era excepcionalmente bajo. Y fué hace sólo unos 20 años, cuando ciertas fracciones subcelulares pudieron ser aisladas y analizadas, que la presencia de hierro no hemínico fué especialmente asociada con ciertas estructuras y actividades enzimáticas (3).

Varios fueron los caminos que condujeron al rápido desarrollo de la bioquímica de las sulfoferroproteínas. Uno de ellos fueron los estudios sobre las fotoreacciones que tenían lugar en el cloroplasto, y que condujeron al descubrimiento de "factores" que eran capaces de fotoreducir cierto tipo de compuestos, en particular hemoproteínas y piridín-nucleótidos (4, 5, 6). Otra vía de desarrollo fué la caracterización en mamíferos y microorganismos de compuestos que mostraban un contenido en hierro varias veces superior al correspondiente a una hemoproteína, y para los cuales era evidente que el hierro, al menos en parte, podía jugar un papel en procesos de óxido-reducción, por cuanto su forma reducida mostraba por resonancia electrónica paramagnética una señal típica de paramagnetismo, no presente en la forma oxidada (7). Finalmente, estudios sobre el mecanismo de fijación del nitrógeno en *Clostridium pasteurianum*, mostraron la necesidad de una proteína de bajo peso molecular, análoga a la anteriormente descubierta por Mortenson y col. (8), como elemento de enlace entre la reacción fosforoclástica del piruvato y el desprendimiento de hidrógeno por el sistema hidrogenásico.

Estos distintos campos de desarrollo fueron posteriormente integrados cuando se observó que la proteína de *Clostridium*, un microorganismo que no depende de la luz, era capaz de

sustituir a los "factores" que se pensaba eran específicos de los tejidos fotosintéticos (9), por lo que poca duda quedó de que ambos tipos de proteínas eran, al menos funcionalmente, equivalentes. Sin embargo, ni la proteína de origen clostridiano ni la de procedencia vegetal mostraban en forma reducida, por resonancia electrónica paramagnética, la señal de paramagnetismo típica de las sulfoferroproteínas de otro origen. Este conflicto fué resuelto cuando las observaciones de Palmer y Sands (10) mostraron que la señal de paramagnetismo era en algunos casos muy sensible a la temperatura, reapareciendo claramente cuando se operaba a temperaturas suficientemente bajas.

Las sulfoferroproteínas constituyen un grupo de ferroproteínas entre las cuales se incluyen además las hemoproteínas, y otro poco específico al que se pueden adscribir las transferrinas, oxigenasas, etc., dentro del cual podemos diferenciar entre aquéllas que no poseen azufre lábil, constituyendo el grupo de las rubredoxinas, y aquéllas otras que liberan SH_2 en medio ácido, y que de una forma general han sido hasta ahora denominadas ferredoxinas. La existencia o no de azufre lábil lleva emparejada también una diferencia en el contenido en hierro, pues mientras las rubredoxinas poseen un solo átomo por molécula, los restantes miembros del grupo presentan al menos dos.

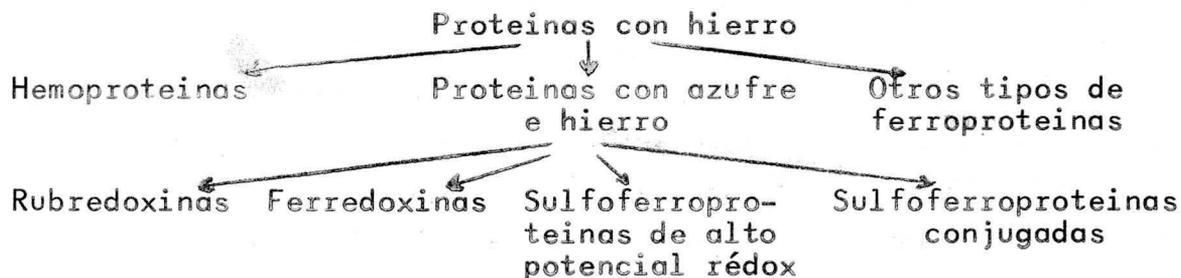
¿Cuál puede considerarse entonces, aparte de la existencia de azufre ácido-lábil, como carácter distintivo de las ferredoxinas? Originalmente este nombre fué dado a la proteína con 8 átomos de hierro aislada de *Clostridium* (8), pero después de la comprobada similitud química y funcional con el factor presente en los cloroplastos, dicho nombre fué extendido a éste (9). Las recomendaciones dadas por la IUPAC-IUB han venido dirigidas a reservar el nombre de ferredoxinas a aquéllos compuestos

que, sobre las propiedades apuntadas, se caracterizan fundamentalmente por exhibir un bajo potencial redox. Por el contrario, la particularidad de catalizar la fotoreducción de piridín-nucleótidos ha de ser abandonada como elemento integrante de dicha definición, si no se quieren excluir del grupo las ferredoxinas de *Azotobacter vinelandii* (11), y otras más.

Si el carácter de bajo potencial redox es esencial, resulta ineludible separar del grupo de ferredoxinas a una serie de proteínas con azufre e hierro que, poseyendo azufre ácido-lábil, presentan por el contrario altos potenciales redox. Esta diferencia se encuentra, además, sustentada por unas distintas características espectrales y, al contrario que las ferredoxinas, por exhibir paramagnetismo en estado oxidado, no en el reducido (12).

Finalmente hay que incluir, al lado de las rubredoxinas, ferredoxinas y ferroproteínas ácido-lábiles de alto potencial redox, un grupo heterogéneo de sulfoferroproteínas que presentan, además, grupos funcionales de naturaleza diversa, metálicos o no. A este grupo pertenecen la molibdo-ferredoxina, una proteína con azufre, hierro y molibdeno, aislada del sistema nitrogenásico de *Azotobacter vinelandii* (13) y *Clostridium pasteurianum* (14).

En resumen, el complejo grupo de las ferroproteínas puede clasificarse según el siguiente esquema:



Proyectos de clasificación de las proteínas con azufre e hierro han sido también hechos atendiendo a sus propiedades espectrales, origen biológico, función metabólica y estricto contenido en hierro. En este último concepto se basa la clasificación propuesta por Malkin (15), y que se expone en la Tabla II.

TABLA II

Clasificación de las sulfoferroproteínas, según Malkin

- I. Proteínas con 2 átomos de hierro por molécula.
 - A. De organismos fotosintéticos: ferredoxinas de cloroplastos.
 - B. De organismos no fotosintéticos: adrenodoxina (16) putidaredoxina (17), proteínas 1 y 2 de *Azotobacter vinelandii* (11), etc.
- II. Proteínas con 4 átomos de hierro por molécula: sulfoferroproteínas de alto potencial rédox.
- III. Proteínas con 8 átomos de hierro por molécula: ferredoxinas de origen bacteriano.
 - A. De organismos fotosintéticos: ferredoxinas de *Chromatium* (18) y *Chlorobium* (19).
 - B. De organismos no fotosintéticos: ferredoxinas de *Clostridium* y *Azotobacter* (20).

En relación con el contenido en hierro y azufre lábil algunos investigadores han propuesto un sistema de denominación en el que el azufre ácido-lábil es representado por S^* . - Así, las ferredoxinas de cloroplastos serían $2Fe-2S^*$, mientras que las clostridianas se representarían como $8Fe-8S^*$.

Un modelo de clasificación ligeramente diferente al anterior fué propuesto por Yasunobu y Tanaka (21), en el que se tuvieron en cuenta algunos resultados obtenidos en la elucidación de la estructura primaria de estas proteínas. En ella se observan algunas contradicciones con la clasificación de Malkin en lo referente al contenido en hierro de determinadas entidades, así como la presencia de ferredoxinas con un número de átomos de hierro por molécula distinto a 2 y 8; por lo demás, la clasificación sigue como criterios básicos la función metabólica y la procedencia biológica, según se ve en la Tabla III.

TABLA III

Clasificación de las sulfoferroproteínas, según Yasunobu y Tanaka

Tipo I. Proteínas que contienen hierro y azufre lábil.

Clase I. Ferredoxinas operativas en procesos de fermentación anaerobia, fijación de nitrógeno y metabolismo del hidrógeno: se corresponden con las ferredoxinas tipo 8Fe, más algunas excepciones tipo 4Fe, como la ferredoxina de *Desulfovibrio* (22).

Clase II. Ferredoxinas de bacterias fotosintéticas: incluye las ferredoxinas de las bacterias púrpuras tipo *Chromatium*, y bacterias verdes tipo *Chlorobium*, cuyo contenido en hierro los autores de la clasificación lo consideran en 5-6 átomos por molécula.

Clase III. Ferredoxinas de algas y plantas superiores, incluyendo las algas verde-azuladas procariotes: son las ferredoxinas tipo 2Fe.

Clase IV. Es un grupo muy impreciso, en el que se engloban aquéllas entidades moleculares del tipo I que no presentan actividades biológicas típicas de las ferredoxinas: adrenodoxina, putidaredoxina, proteínas 1 y 2 de *Azotobacter*, etc., todas ellas con 2Fe, y la sulfoferroproteína de alto potencial redox de *Chromatium* (23), con 4Fe.

Tipo II. Proteínas que contienen hierro, pero no azufre lábil: incluye las distintas clases de rubredoxinas, con 1Fe por molécula.

Aunque las sulfoferroproteínas de elevado potencial rédox y las rubredoxinas no se han encontrado hasta ahora ampliamente distribuidas en la naturaleza, su estudio ha experimentado últimamente un gran impulso, seguramente como consecuencia de las observadas amplias relaciones estructurales que presentan con las ferredoxinas, y las indudables relaciones genéticas que de ello podrían derivarse (24).

Son, sin embargo, las ferredoxinas las sulfoferroproteínas que han sido objeto de mayor atención, desde que en 1962 Mortenson y Valentine (8, 25, 26) las caracterizaron como elemento esencial de transporte electrónico en reacciones clave de óxido-reducción. Ya con anterioridad Davenport y col. (27, 28) observaron que una fracción proteica aislada de hojas de espinaca era activa en la reducción catalítica de algunas hemoproteínas por cloroplastos iluminados, denominándola "metmyoglobin reducing factor", mientras que casi paralelamente San Pietro y Lang (29, 30) individualizaban a partir de hojas de espinaca una fracción activa como catalizador de la reducción fotoquímica del trifosfopiridín-nucleótido, llamándola "photosynthetic pyridine nucleotide reductase".

Poco después Davenport (31) llegó a la conclusión de que ambos compuestos eran funcionalmente intercambiables e indistinguibles en ambas reacciones fotoquímicas. Finalmente, Tagawa y Arnon (9) demostraron que el compuesto aislado por Mortenson de *Clostridium pasterianum*, y los "factores" de procedencia vegetal de Davenport y San Pietro, eran también intercambiables al menos cualitativamente como catalizadores de la fotoreducción del NADP, proponiendo el nombre de ferredoxinas para este grupo de sustancias. Una serie de investigadores pusieron de manifiesto que esta reducción del adenin-dinucleótido tenía lugar, no sólo por cloroplastos iluminados, sino también por ex--

tractos acelulares de Clostridium en ausencia de luz (26,32,33)

Constituyó, ciertamente, un hecho poco afortunado - que fueran las ferredoxinas de Clostridium y espinaca las primeras objeto de atención, ya que la complicada estructura de la primera, y las dificultades inherentes a no trabajar con microorganismos, de corto ciclo vegetativo, de la segunda, motivó una primera fase de estancamiento de los estudios sobre ~~sulfoferro~~ proteínas. Sin embargo, una vez superada ésta, numerosas investigaciones han sido desde entonces efectuadas sobre ferredoxinas en relación con su aislamiento y purificación que, desde las primeras cristalizaciones de las ferredoxinas de espinaca por Tagawa y Arnon (9), y de Clostridium pasterianum por Lovenberg y Sobel (34), han conducido en estudios posteriores al análisis de aspectos relacionados con su composición y secuencia de aminoácidos, magnitud molecular, características espectrales, contenido en hierro y azufre lábil, estructura del centro activo, potencial rédox y cambios electrónicos en las reacciones en que intervienen, etc.

Magníficas revisiones sobre todos estos aspectos han venido siendo hechas por Valentine (35), Buchanan (36), Malkin y Rabinowitz (37), Kimura (38), Hardy y Burns (39), Hall y Evans (40), Buchanan y Arnon (6,41) y Tsibris y Woody (42).

A medida que las investigaciones sobre ferredoxinas se han ido extendiendo a más y más organismos, nuevos procesos biológicos han ido apareciendo mediatizados por reacciones en las que de una forma u otra las ferredoxinas se encuentran involucradas (Tabla IV).

TABLA IV

Procesos metabólicos en que intervienen las ferredoxinas

<u>Reacción</u>	<u>Material biológico</u>	<u>Referencia</u>
$\text{Piruvato} + \text{P}_i \xrightarrow{\text{CoA}} \text{Acetil-P} + \text{CO}_2 + \text{H}_2$	{ Clostridium Micrococcus	Mortenson y col. (8, 43) Valentine y Wolfe (44)
$\text{H}_2 + \text{NADP}^+ \rightleftharpoons \text{NADPH} + \text{H}^+$	{ Clostridium Micrococcus Chromatium	Valentine y col. (26); Jungermann y col. (45) Whiteley y Woolfolk (46) Buchanan y Bachofen (32)
$\text{Piruvato} + \text{NADP}^+ \longrightarrow \text{NADPH}$	Clostridium	Valentine y col. (26)
$\text{Piruvato} + \text{NAD}^+ \longrightarrow \text{NADH}$	Clostridium	Valentine y col. (47)
$\text{Piruvato} + \text{urato} \longrightarrow \text{Xantina}$	Clostridium	Valentine y col. (47)
$\text{Acetil-CoA} + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{Piruvato}$	{ Clostridium Chromatium	Bachofen y col. (48); Andrew y Morris (49) Buchanan y col. (50)
$\text{Propionil-CoA} + \text{CO}_2 \longrightarrow \alpha\text{-ceto-butirato}$	{ Clostridium Chromatium	Buchanan (51) Buchanan (51)
$\text{Succinil-CoA} + \text{CO}_2 \longrightarrow \alpha\text{-cetoglu-tarato}$	{ Chlorobium Bacteroides	Buchanan y Evans (52) Allison y Robinson (53)
$\text{Isobutiril-CoA} + \text{CO}_2 \longrightarrow \alpha\text{-cetoiso-valerato}$	Peptostrepto-coccus	Allison y Peel (54)
$\text{Fenilacetil-CoA} + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{Fenilpiruva to}$	Chromatium	Gehring y Arnon (55)

TABLA IV (continuación)

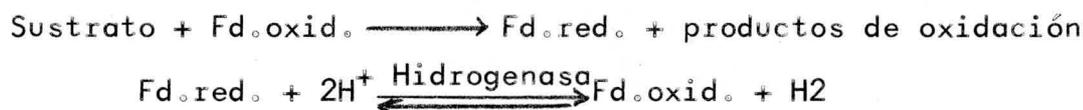
<u>Reacción</u>	<u>Material biológico</u>	<u>Referencia</u>
A.6-hidroxinico tínico \longrightarrow A.6-cetotetra hidronicotini co	Clostridium	Holcenberg y Tsai (56)
$\text{CO}_2 \longrightarrow$ Formato	Clostridium	Jungermann y col. (57); Thauer y col. (58)
$\text{N}_2 + 3\text{H}_2 \longrightarrow 2\text{NH}_3$	{ Clostridium Azotobacter Chromatium	Mortenson y col. (43); D'Eustachio y Hardy (59) Yoch y col. (20); Der Varta nian y col. (60) Yoch y Arnon (61)
Hipoxantina \longrightarrow Xantina + H_2	Micrococcus	Valentine y col. (25)
FMN (ó FAD) + $\text{H}_2 \longrightarrow$ FMNH ₂ (ó FADH ₂)	Micrococcus	Whiteley y Woolfolk (46)
Riboflavina + $\text{H}_2 \longrightarrow$ Flavina red.	Micrococcus	Whiteley y Woolfolk (46)
Acetaldehido \longrightarrow Acetato	Methano- bacillus	Buchanan y col. (50)
$\text{NAD}^+ + \text{H}_2 \longrightarrow \text{NADH} + \text{H}^+$	Chromatium	Weaver y col. (62)
Sulfito \longrightarrow Sulfuro	{ Clostridium Plantas	Agaki (63) Schmidt y Trebst (64)
NO_2^- (ó NH_2OH) + $\text{H}_2 \longrightarrow \text{NH}_3$	Clostridium	Mortenson y col. (8); Valentine y col. (65)
Reducción de NO_2^- por la luz	Plantas	Ramírez y col. (66)

TABLA IV (continuación)

<u>Reacción</u>	<u>Material biológico</u>	<u>Referencia</u>
Reducción de NADP por la luz	Plantas	Tagawa y Arnon (9); Shin y Arnon (67)
Fotoproducción de O ₂	Plantas	Arnon y col. (68)
Captación de O ₂ y eliminación del radical superóxido	Plantas	Allen (69)
Producción de ATP (fotofosforilación cíclica)	Plantas	Tagawa y col. (70)
Producción de ATP (fotofosforilación acíclica)	Plantas	Arnon y col. (68)
$\text{NO}_3^- \longrightarrow \text{NO}_2^-$	Plantas	Losada y Paneque (71)
Activación de la fructosa-1,6-difosfatasa	Plantas	Buchanan y col. (72, 73)

Todas estas reacciones pueden agruparse en tres grandes epígrafes:

a) Reacciones en las que hay un desprendimiento de H_2 . Todo organismo que oxida un sustrato con formación de ferredoxina reducida, y contiene además hidrogenasa, con toda seguridad desprende H_2 como parte de su metabolismo:



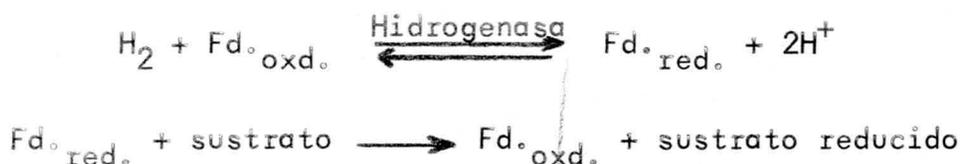
siendo el ejemplo más representativo la reacción fosforoclástica del piruvato:



reacción inversa de las carboxilaciones reductivas de los acil-CoA, que requieren un gasto de ferredoxina reducida (74).

b) Oxidaciones de sustratos que, a través de la ferredoxina, conducen a la reducción de sistemas coenzimáticos (NADP, NAD, FMN, etc.). Un ejemplo típico es la reducción del NADP por la ferredoxina-NADP-reductasa del cloroplasto, en que la ferredoxina reducida necesaria se produce a través de la cadena acíclica de oxidación del agua.

c) En aquellas circunstancias en que el aporte de sustratos reducidos es bajo y que, presentan disponibilidades de gas H_2 , la ferredoxina reducida necesaria para algunos procesos puede producirse a partir de éste, supuesta la existencia del sistema hidrogenásico:



Tal es el caso de la ferredoxina reducida requerida para la fijación del N_2 por el sistema de la nitrogenasa.

Además de los procesos mencionados, en los que se encuentra perfectamente establecida la participación de la ferredoxina, existen otros ~~en que su incidencia es evidente~~, aunque aún no haya podido determinarse de forma concreta. Así, el efecto estimulador que el pirofosfato se ha observado ejerce sobre la fijación del CO_2 , se ha podido comprobar (75) es debido a que inhibe en la cadena acíclica de transferencia electrónica el transporte desde la ferredoxina reducida al grupo flavínico de la ferredoxin-NADP-reductasa, induciendo entonces un incremento del nivel de ferredoxina reducida. Aunque se ha comprobado una activación por ésta de la fructosa-1,6-difosfatasa del ciclo de Calvin (72,73), existen razones para pensar que esta activación se ejerza también de forma más o menos indirecta a través de la carboxi-dismutasa (76,77).

De todo lo expuesto se desprende el gran número de organismos estudiados con la ferredoxina, abarcando tanto algas unicelulares verde-azuladas procariones, como bacterias aerobias y anaerobias, bacterias fotosintéticas verdes y púrpuras, azufradas o no, algas y vegetales superiores.

En muchas de ellas, los estudios no han pasado más allá de haber puesto de manifiesto su existencia en extractos crudos por medio de reacciones ferredoxin-dependientes. No obstante, se incluyen también en la Tabla V.

TABLA V

Organismos en los que se ha puesto de manifiesto la existencia de ferredoxinas

A.- Algas unicelulares verde-azulada (procariotes).

Nostoc muscorum (4); *Tolypothrix* (78); *Anabaena variabilis* (78); *Anacystis nidulans* (79, 80); *Spirulina maxima* (81); *Microcystis* (82); *Aphanotece* (83) y, además, *Phormidium*.

B.- Bacterias fotosintéticas verdes o púrpuras (azufradas o no).

Chlorobium thiosulfatophilum (19); *Chloropseudomonas ethylicum* (84); *Chromatium* (18); *Rhodopseudomonas palustris* (85); *Rhodospirillum rubrum* (9).

C.- Bacterias no fotosintéticas (aerobias o anaerobias).

Azotobacter vinelandii (60, 86); *Clostridium pasterianum* (9, 87, 88, 89, 90); *Cl. butyricum* (91); *Cl. acidurici* (91); *Cl. Kluveri* (35, 49); *Cl. tetanomorphum* (91); *Cl. cylindrosporum* (91); *Cl. thermosaccharolyticum* (92); *Cl. nigrificans* (63); *Cl. lactoacetophilum* (44); *Cl. stricklandii* (93); *Cl. botulinum* (94); *Cl. tartarivorum* (95); *Methanobacter omelianskii* (96); *Desulfovibrio gigas* (97); *D. desulfuricans* (98); *Micrococcus lactolyticus* (25, 44); *Micrococcus aerogenes* (99); *Pseudomonas elsdenii* (100); *Diplococcus glycinophilus* (35); *Peptococcus glycinophilus* (47); *Butybacterium rettgeri* (44); *Bacillus pbymyxa* (101, 102) y, además, *Agrobacterium*.

D.- Algas (eucariotes).

Chlorella (103); *Porphyra tenera* (5); *Euglena gracillis* (104)

Chlamydomonas (79,104); Navicula pelliculosa (78); Scenedesmus (105,106); Laminum album (31); Bumilleriopsis filiformis (107); Porphyridium cruentum (104); Botrydiopsis alpina (104) y, además, Cladophora.

E.- Vegetales superiores.

Espinaca (4,5,9,108,109); maíz (110); perejil (111,112); - Brassica campestris (113); guisante (31); Chenopodium bonus (31); Aethusa cynapium (31); Stellaria media (28); Datura (114); algodón (115); alfalfa (116,117); Leucaena glauca - (118); Amaranthus (119); Pinus pinea (120); Colocasia esculenta (121); Equisetum (122); Polystichum munitum (119); - Thuja (123); Taxus (123); Pinus pinaster (123); soja (124) y Cyperus (125).

Un aspecto de desarrollo reciente es el relacionado con la presencia en ciertas bacterias de dos tipos distintos de ferredoxinas. Así, en Azotobacter vinelandii se han aislado las llamadas por Yoch y Arnon (86) ferredoxinas I y II, la primera cinco veces más abundante que la segunda, siendo la I la señalada previamente por Yoch y col. (20) como donadora de electrones en el sistema de la nitrogenasa. Dos formas de ferredoxinas ligadas a estructuras celulares han sido descritas en la bacteria púrpura no azufrada Rhodospirillum rubrum (126,127), con distinto contenido en hierro una de otra, y también otros dos tipos de ferredoxinas en Bacillus polymyxa (128).

Por otro lado, el hecho parece también presentarse en vegetales superiores, habiéndose descrito dos tipos de ferredoxinas en soja (124) y guisante (129); y en espinaca, además -



de la ferredoxina soluble, un tipo de ferredoxina ligada (130). El significado biológico de esta heterogeneidad en el contenido en ferredoxinas no está ni muchos menos dilucidado, aunque a dicha ferredoxina ligada de espinaca se la quiere identificar como el aceptor primario de electrones del fotosistema I de la cadena acíclica de transporte electrónico (131, 132).

Un aspecto que ha sido esencial para el amplio y rápido desarrollo de los estudios sobre ferredoxinas es su implicación en la resolución de problemas evolutivos. Numerosas son las razones que han hecho de estos compuestos auténticas "vedettes" para la elucidación de las relaciones filogenéticas existentes entre distintos grupos biológicos, especialmente en el reino vegetal.

Por un lado, y desde un punto de vista de estructura molecular, pueden analizarse las relaciones evolutivas de las distintas ferredoxinas no sólo a través de la secuencia en aminoácidos de su armazón proteica, sino también a partir del número y estructura de sus centros activos. En este último aspecto especial atención ha sido prestada al análisis del contenido en azufre lábil e hierro, a los estados de oxidación de éste y a la química de su coordinación, campo que ha recibido aportaciones de la bioquímica, espectroscopía, química inorgánica, química-física y cristalografía.

El análisis secuencial de la estructura primaria de las ferredoxinas ha sido abordado principalmente por el grupo de Tanaka y Yasunobu, muy polarizado en las de origen bacteriano, y por el grupo de Matsubara, más dirigido a las de organismos fotosintéticos. Entre las primeras han sido secuenciadas hasta la fecha las de *Clostridium pasteurianum* (90), *Cl. butyricum* (133), *Cl. acidurici* (134), *Cl. tartarivorum* (95), *Micrococcus*

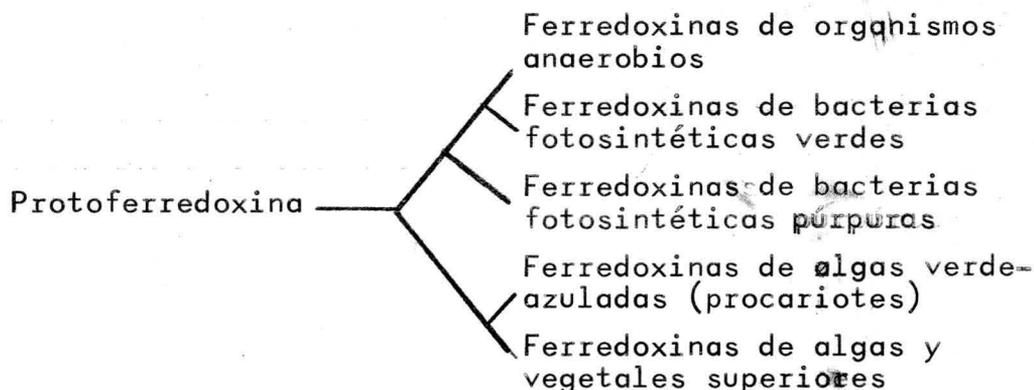
aerogenes (99) y Desulfovibrio gigas (135), y entre las segundas las de Chromatium (136), Scenedesmus (106), espinaca (137), alfalfa (117), Leucaena glauca (118) y Colocasia esculenta (138).

En segundo lugar, la amplia distribución de las ferredoxinas en la escala biológica, que va desde organismos anaerobios a aerobios, hace posible abarcar un amplísimo margen de la misma, cosa imposible, por ejemplo, con las hemoproteínas, grupo de sustancias también atendidas en términos evolutivos; de esta forma se puede descender a las formas más ancestrales de vida a través de estos compuestos. Efectivamente, el árbol genealógico de las ferredoxinas ha ido creciendo hasta alcanzar un tamaño respetable, y hasta el presente es seguramente el más denso conocido.

Por otro lado, las relaciones ~~secuenciales~~ de las ferredoxinas con otras sulfoferroproteínas también han contribuido a sacar conclusiones en términos evolutivos. Así, las indudables relaciones en su estructura primaria con las rubredoxinas (24) parecen indicar que todas proceden de un tipo ancestral común (95, 117, 137). Otras veces, por el contrario, ha resultado imposible encontrar semejanzas secuenciales entre las ferredoxinas y otras sulfoferroproteínas, incluso con algunas proteínas no férricas que, como las flavodoxinas, pueden en Clostridium pasterianum sustituir en sus funciones a la ferredoxina casi con la misma efectividad (139, 140). En tales casos no parece lógico deducir que la naturaleza haya ideado un mismo tipo de función de forma duplicada e independiente, sino más bien que la primitiva semejanza en la matriz proteica ha desaparecido con el tiempo.

Hasta ahora, y limitándose al campo estricto de las ferredoxinas, se supone que todas proceden de una "protoferre-

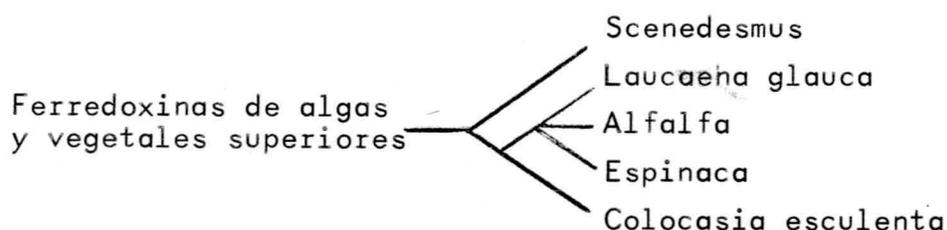
doxina" ancestral, que ha ido sufriendo modificaciones a medida que el primitivo gen ha sido sometido a mutaciones y otras aberraciones cromosómicas. En ese sentido Matsubara (141) ha propuesto el siguiente esquema filogenético:



El punto conflictivo radicó en la localización de las algas verdes-azuladas. Según Stanier (142) estos procariotes deben considerarse más como bacterias que como algas, lo que está en contradicción con su contenido 2Fe por molécula de ferredoxina (80), frente a los 8 Fe de las de origen bacteriano, y con sus evidentes analogías con las ferredoxinas de algas en lo referente a la composición (143) y secuencia de aminoácidos (81). Cammack y col. (144) suponen que esta similitud radica en que los procariotes verde-azulados son los primitivos precursores de los cloroplastos de algas y plantas, por las cuales fueron fagocitados hace millones de años, viviendo primero simbióticamente y transformándose después en los actuales cloroplastos.

Por lo que respecta al grupo de ferredoxinas de algas y vegetales superiores, las relaciones filogenéticas que han podido establecerse entre ellas son muy vagas, pues todas presentan el mismo centro activo 2Fe-2S* y, hasta la fecha, só

lo han sido secuenciadas, según apuntamos antes, las del alga - Scenedesmus (106), la monocotiledónea Colocasia esculenta (138) y, entre las dicotiledóneas, las de espinaca (137) (Quenopodiácea), alfalfa (117) y Leucaena glauca (118) (Leguminosas). No obstante, Rao y Matsubara (138) y Cammack y col. (144) han diseñado a partir de estos escasos datos un árbol genético que, según ellos, está de acuerdo con las clasificaciones taxonómicas deducidas de datos morfológicos:



Como puede observarse, las conclusiones son muy pobres y de difícil fiabilidad, dada la escasez de especies y grupos taxonómicos estudiados. Especialmente resulta esto evidente dentro del grupo de las Fanerógamas, donde sobre las 4 especies cuyas ferredoxinas han sido secuenciadas, hay que agregar 7 más que han sido purificadas hasta homogeneidad, 10 más cuya existencia ha sido comprobada por alguna reacción específica (Tabla VI). De todas ellas, sólo las de espinaca y perejil han sido obtenidas en forma cristalizada (9, 112, 145).

La comparación de las cuatro ferredoxinas de plantas superiores hasta ahora secuenciadas muestra un contenido de 97 aminoácidos por molécula, a excepción de la de *Leucaena glauca* que presenta 96. Si ahora atendemos a la naturaleza y posición de los mismos, la similitud por pareja de especies oscila entre los 74 restos para el par *L. glauca*-alfalfa, 81 para el *Colocasia*-alfalfa. Finalmente, consideradas las cuatro especies en su

TABLA VI

Especies de Fanerógamas cuyas ferredoxinas han sido hasta la fecha secuenciadas (S), purificadas (P), cristalizadas (C) o solamente detectadas (D).

Gimnospermas	Coníferas	}	Pinus pinea	P		
			Pinus pinaster	D		
			Thuja	D		
			Taxus	D		
Angiospermas	Monocotiledóneas	}	Ciperáceas	Cyperus	D	
			Aráceas	Colocasia esculenta	P-S	
			Gramíneas	Zea mays	P	
	Dicotiledóneas	}	Quenopodiáceas	Chenopodium bonus	D	
				Spinacia oleracea	P-C-S	
		}	Amaractáceas	Amaranthus edulis	P	
			Cariofiláceas	Stellaria media	D	
		}	Crucíferas	Brassica campestris	D	
				Umbelíferas	Aethusa cynapium	D
		}	}	Malváceas	Petroselinum sativum	P-C
					Gossypium	P
		}	}	Leguminosas	Leucaena glauca	P-S
					Medicago sativa	P-S
Pisum sativum	P					
Glycina maxima	P					
}	}	Solanáceas	Datura	D		

conjunto, esta similitud alcanza a 69 aminoácidos sobre un total de 97, lo que representa una homología del 71%. De ello se deduce que, indudablemente, existe una homogeneidad entre las ferredoxinas de estas cuatro Fanerógamas (141, 146) y, puesto que se calcula una antigüedad de 100 millones de años a la aparición - de las primeras plantas superiores, hay que admitir una lenta - tasa de cambio en la estructura primaria de estas moléculas, seguramente por existir una dependencia estricta entre estructura y función en las mismas.

La existencia de notables diferencias secuenciales se pone, no obstante, de manifiesto cuando se comparan los mapas peptídicos obtenidos en la hidrólisis parcial de las ferredoxinas de espinaca y Colocasia (121). Por otra parte, se ha comprobado que la mayor parte de los restos con carácter hidrofóbico se encuentran englobados en el interior de la molécula, mientras que casi todos los residuos iónicos - en los que normalmente recae la responsabilidad de la acción biológica - se encuentran localizados en la superficie de la misma (21). Es lógico - entonces pensar que la sustitución de un resto ionizable por -- otro no ionizable, ó viceversa, puede conducir a drásticos cambios en la funcionalidad de la ferredoxina. Posiblemente sea esto lo que cause las diferencias cuantitativas, más o menos marcadas, entre la operatividad de una u otra ferredoxina en las reacciones ferredoxin-dependientes, como se deduce observando el número total de restos ionizables, y las diferencias inter especies entre posiciones secuenciales ocupadas por grupos iónicos y por residuos de otra naturaleza (117, 118, 137, 138) (Tabla VII).

TABLA VII

Número de restos ionizables, y diferencias secuenciales interes-
pecies entre restos con carácter iónico y no iónico.

	<u>Restos</u> <u>iónicos</u>	<u>C.esculenta</u>	<u>Espinaca</u>	<u>Alfalfa</u>	<u>L.glauca</u>
C. esculenta	29	-	6	8	7
Espinaca.....	28	6	-	9	11
Alfalfa.....	31	8	9	-	7
L.glauca.....	33	7	11	7	-

Constituyen, pues, las reacciones dependientes de fe rredoxinas el banco de prueba complementario para analizar las - diferencias interespecíficas entre las ferredoxinas de distinto origen, ya que, si bien en todas ellas la ferredoxina actúa como simple transportador electrónico, su acoplamiento al sistema enzimático responsable de la reacción en cuestión y, en consecuencia, el grado de operatividad de ésta, vendrá regido por la afinidad molecular ferredoxina-enzima, permitiendo así analizar el comportamiento de aquella, homóloga o heteróloga, frente al - enzima homólogo correspondiente.

De todas las reacciones ferredoxin-dependientes descritas hasta la fecha, constituye el test de la ferredoxin-NADP- -reductasa el más asiduamente utilizado como término de compara - ción de operatividad frente a ferredoxinas de distinta procedencia, utilizando cloroplastos lisados y lavados de espinaca como fuente de enzima (147).

Los datos hasta ahora existentes demuestran que, en relación con la ferredoxin-NADP-reductasa, las ferredoxinas de distinto origen exhiben un nivel de operatividad con valores bas - tante de acuerdo con las consideraciones filogenéticas menciona

das anteriormente, deducidas a partir de las estructuras moleculares de las ferredoxinas correspondientes.

Según Foust y col. (148) las diferentes actividades que presentan las ferredoxinas radican en su distinta capacidad de transferencia electrónica al grupo flavínico de la ferredoxin-NADP-reductasa, consecuencia de variaciones estructurales que las diferencian unas de otras. Si bien existe un intercambio funcional entre las distintas ferredoxinas, es claro que la ferredoxin-NADP-reductasa prefiere su ferredoxina homóloga.

Otra serie de reacciones ferredoxin-dependientes analizadas en función de la especificidad de la ferredoxina son las de carboxilación reductiva. Preparados de piruvato-sintasa y α -cetoglutarato-sintasa de *Chlorobium thiosulfatophilum* y *Chromatium* se muestran igualmente efectivos en la carboxilación del acetil-CoA y succinil-CoA en presencia de ferredoxina de una u otra procedencia, reducida bien por el sistema H_2 -hidrogenasa, bien fotoquímicamente por la acción de cloroplastos aislados (33). Las ferredoxinas de bacterias anaerobias no fotosintéticas se muestran también muy operativas con la piruvato-sintasa, pero menos con la α -cetoglutarato-sintasa, mientras que las de algas y plantas superiores se muestran con ambas actividades muy disminuidas (149).

Sorprendentemente, la α -cetobutirato-sintasa de *Chromatium* se muestra igual de operativa con su ferredoxina homóloga y de otras bacterias fotosintéticas, con las de bacterias no fotosintéticas, y aún la de espinaca (74). Por el contrario, la fenilpiruvato-sintasa de *Chromatium* es plenamente activa con ferredoxinas de bacterias fotosintéticas, disminuyendo su operatividad a la mitad y cuarta parte con las de aerobios y anaerobios no fotosintéticos, respectivamente, y anulándose con la de espi

naca (55). En conjunto, puede observarse poca unidad en los resultados, necesitándose experiencias adicionales y más sistemá-
tizadas.

La reacción fosforoclástica ha sido sólo estudiada en relación con el enzima de *Clostridium*, frente al cual ambas ferredoxinas de *Azotobacter* muestran sólo un 10% de actividad respecto a la ferredoxina nativa (86). En cuanto a la ferredoxina de *Chromatium*, presenta la particularidad frente a las de otra procedencia, que no es reducida por el sistema H_2 -hidrogenasa, diferenciándose también por no reducirse directamente por diti-
nito (149), probablemente según Hall y Evans (40) debido a consideraciones de tipo estérico.

Aunque no se han usado ferredoxinas heterólogas en ensayos de especificidad en relación con la nitrito-reductasa, se ha comprobado con el enzima de *Chlorella* que su ferredoxina puede ser sustituida por flavodoxina (150), cosa anteriormente ya comprobada con la nitrito-reductasa de espinaca y fitoflavina (flavodoxina) aislada de *Anacystis* (151). Esta flavoproteína carece de hierro y presenta un resto de FMN como grupo transportador, habiéndose demostrado su capacidad de sustituir a la ferredoxina, casi con igual eficacia, en una serie de reacciones ferredoxin-dependientes en *Clostridium pasteurianum* (139). Su composición y secuencia de aminoácidos no guarda ninguna relación con la de las ferredoxinas, estimulándose su síntesis, y sustituyendo entonces a éstas, en condiciones de bajas disponibilidades de hierro (151).

Finalmente, nosotros hemos extendido en este trabajo los test de especificidad a la fructosa-1,6-difosfatasa foto sintética, cuya dependencia de ferredoxina fué puesta de manifiesto por Buchanan y col. (73), y en la que venimos trabajando

desde hace unos años en relación con su estructura y mecanismo de acción.

De todo lo expuesto se deduce que antes de llegar a conclusiones más definitivas sobre relaciones filogenéticas entre unas ferredoxinas y otras, y a conclusiones precisas sobre la dualidad estructura-función, resulta necesario proseguir - los estudios sobre características físico-químicas y relaciones interespecíficas de nuevas ferredoxinas, especialmente con las procedentes de aquéllos grupos taxonómicos hasta ahora no estudiados.

Con el presente trabajo pretendemos llenar la laguna existente en este terreno dentro del grupo de las Compuestas, familia botánica hasta ahora inédita en estudios sobre ferredoxinas y que, por la enorme cantidad de especies que engloba, y su situación taxonómica como estadio más evolucionado del grupo de las Angiospermas dicotiledóneas, pensamos pueda aportar aspectos nuevos en este campo.

PLAN DE TRABAJO

A la luz de los antecedentes bibliográficos expuestos, se decidió acometer el estudio de la ferredoxina de lechuga (*Lactuca sativa*), especie de la familia de las Compuestas. Al mismo tiempo, y sólo como elemento de contraste de técnicas y comparación de resultados, se hizo un análisis paralelo de la ferredoxina de espinaca (*Spinacia oleracea*), especie de la familia Quenopodiaceas, ya exhaustivamente estudiada con anterioridad por numerosos investigadores.

El desarrollo de la parte experimental se ha dividido en tres grandes apartados. En el primero se describen los métodos preparativos de las ferredoxinas de espinaca y lechuga, así como las técnicas colateralmente empleadas en el control de dichos procesos de purificación. El segundo apartado comprende un estudio comparado entre ambas ferredoxinas, de algunas características físico-químicas de las mismas. Finalmente, en el tercero se analizan, también de forma comparativa, las relaciones de especificidad biológica existentes entre ambas ferredoxinas en conexión con un grupo de actividades enzimáticas ferredoxin-dependientes.

El planteamiento experimental en relación con el número de repeticiones efectuadas para cada determinación ha sido forzosamente poco homogéneo, dada la naturaleza heterogénea de los métodos utilizados. En relación con el primer apartado, han sido numerosas las veces en que se ha repetido el proceso preparativo como fuente de material purificado para las determinaciones subsiguientes. En todas ellas, la evolución de las experiencias ha sido paralela, por lo que, para evitar reiteraciones innecesarias, hemos incluido en el protocolo de resultados sólo el desarrollo de uno de los procesos de purificación.

Por lo que respecta a las determinaciones físico-químicas del segundo apartado, la gran cantidad de material purificado necesario para la mayor parte de las mismas obligó a limitar muchas de éstas a una sola determinación. Se excluyeron las dosificaciones de azufre como S^{2-} y de hierro, para las que se adoptó el diseño de triple determinación. Por otro lado, algunas determinaciones, como la del potencial redox, suministran en una sola experiencia varios resultados del mismo, como consecuencia de establecerse a lo largo de la misma distintas situaciones de equilibrio entre los sistemas reaccionantes; en la práctica, pues, el efecto es análogo al de determinaciones repetidas.

Finalmente los test biológicos de especificidad enzimática permitieron, dadas las pequeñas exigencias de material purificado, efectuar las determinaciones por triplicado.

PARTE EXPERIMENTAL

I. PREPARACION DE FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.

Aunque la preparación de ferredoxina de espinaca ha sido ampliamente descrita en diferentes publicaciones (145) (152) (41), la hemos purificado paralelamente a de lechuga utilizando la misma técnica desarrollada para esta última, salvo ligeras modificaciones. Esto nos ha permitido, en primer lugar, someter a chequeo la validez del método de purificación y, en segundo lugar, disponer de ambas ferredoxinas en un estado de pureza que nos permite efectuar un estudio comparado de las características físico-químicas, y especificidad de origen en relación con una serie de reacciones -enzimáticas en las que este compuesto representa un eslabón esencial.

1.- Material biológico de partida.

1.1.- Material utilizado: preparación previa.

Se utilizaron espinacas y lechugas frescas procedentes del mercado de la localidad, en lotes de 3Kg. de espinacas

y 8 Kg. de lechugas, aproximadamente, cada vez. A las hojas de espinacas se les eliminaron los peciolos y a las de lechuga, además, la base del limbo poco rica en cloroplastos; se lavaron abundantemente y sucesivamente con agua del grifo y agua destilada, y se secaron entre papeles de filtro. Una vez separadas las nervaciones principales se mantuvieron en bolsas de plástico a -20°C hasta congelación.

1.2.- Preparación de extractos crudos.

1.2.1.- Metodica.

Las hojas congeladas quebradas a mano se homogeneizaron ~~en frío en un~~ homogeneizador (Sorvall, Omni-mixer) durante 3 min. a velocidad tope, previa adición de buffer Tris-ClH pH 7.3 ~~adicionado~~ de Tritón X-100, en relación 1:1 (p/v) - para las de espinaca, y 4:3 (p/v) para las de lechuga.

El homogenado se pasó a través de una triple capa de gasa de nylon, y el filtrado se sometió a centrifugación a 11000 r.p.m. ($20000 \times g$) durante 30 min. en centrifuga réfrigerada a 4°C (Sorvall Superspeed, RC2-B). Los sobrenadantes ~~de-~~cantados ~~aproximadamente~~ 1600 y 2300 ml. en cada lote- se utilizaron como material de partida en el proceso de purificación de ambas ferredoxinas.

1.2.2.- Reactivos.

Buffer Tris-ClH 0.1 M. pH 7.3, 0.1% en Tri-tón X-100.

Tris 0.2 M. (24.228 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.) 500 ml.

ClH aprox. 0.2 M. (16.6 ml./l. de ClH fumante $d=1.19$, calidad Merck p.a.) 370 ml.

Se ajusta al pH-metro (Beckman-Expandomatic) con la solución clorhídrica, y se enrasa a 1 litro con agua dest. A continuación se llevó al 0.1% (v/v) con Tritón X-100, calidad Sigma.

2.- Test de contenido protéico, pureza y operatividad.

2.1.- Determinación del contenido protéico.

2.1.1.- Método de Lowry y col.(153).

Método espectrofotométrico basado en las reacciones del biuret -característica del enlace peptídico- y de Folin -específica de los núcleos aromáticos de naturaleza fenólica-; es aplicable a todos los estadios de purificación, teniendo un carácter inespecífico.

2.1.1.1.- Curva standard de albúmina sérica bovina.

Dado el carácter genérico de la reacción, resulta ineludible referir los resultados a una proteína de calibración. Como tal se utilizó albúmina sérica bovina, a partir de la cual se preparó una solución madre en agua dest. a la concentración de $500\mu\text{g/ml.}$, y por dilución al 1/10 de la misma una solución hija con $50\mu\text{g/ml.}$ de proteína.

Diluciones sucesivas al 4/5, 3/5, 2/5, 1/5 y 1/10 de ambas nos dan una gama de concentraciones de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300 y $400\mu\text{g/ml.}$, de cada una de las cuales se dispuso 1 ml. en sendos tubos de ensayo; un último tubo con 1 ml. de agua dest. servirá de blanco.

2.1.1.2.- Metodica.

A tiempo cero se agrega

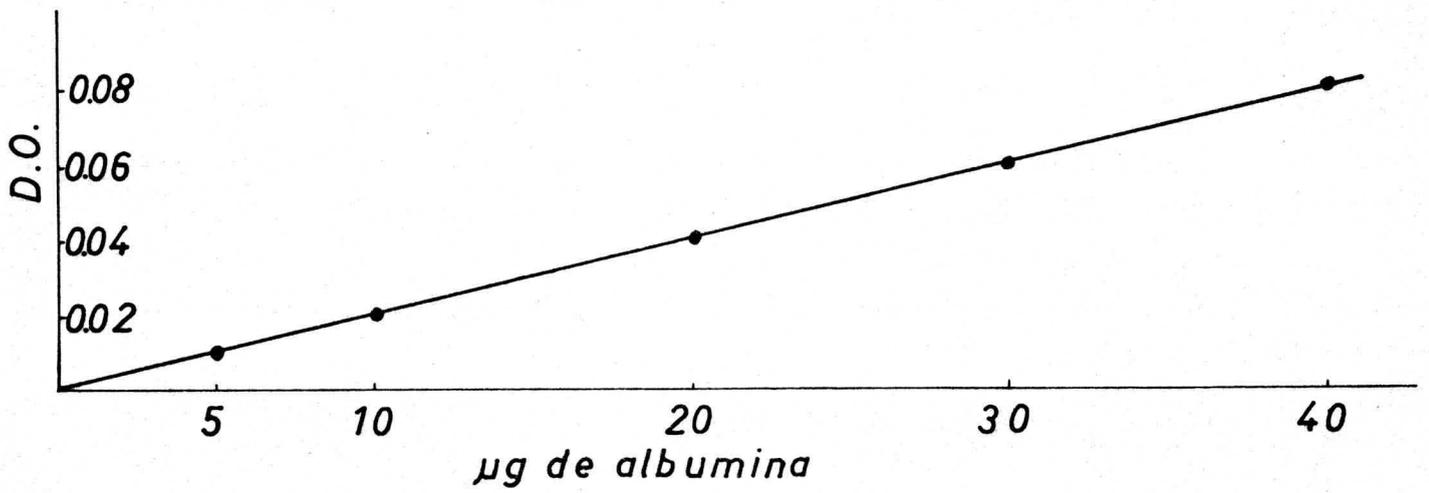
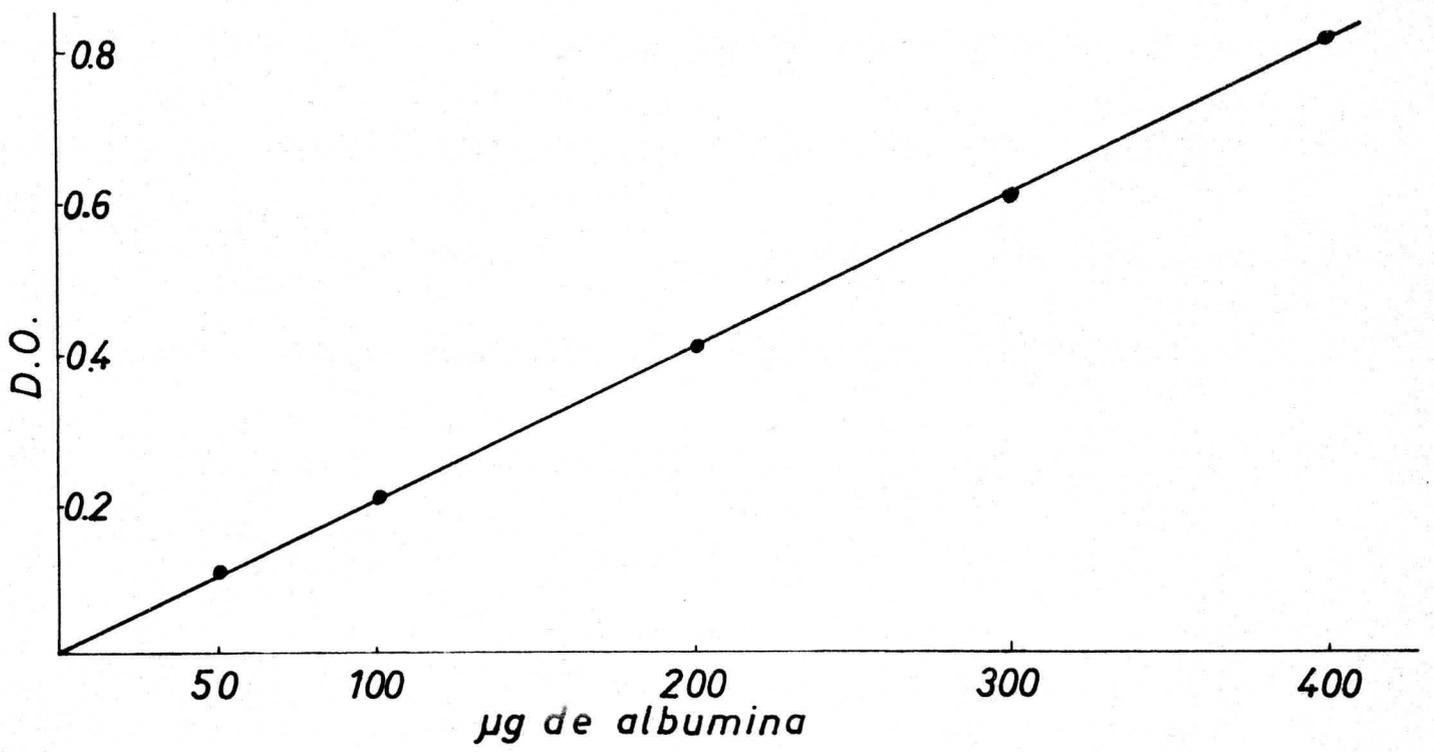


Fig. 1

a cada uno de los tubos anteriores 5 ml. de solución alcalina de cobre -reacción del biuret-, y al cabo de 15 min. se añaden 0.5 ml. del reactivo de Folin-Ciocalteu. Pasados 20 min. más se efectúa la lectura espectrofotométrica a 630 nm. (Perkin-Elmer, mod.124).

Los valores de absorción obtenidos se llevan al eje de ordenadas de un sistema coordinado, situándose en abcisas - los correspondientes valores de cantidad de proteína.

La misma metódica se sigue cuando se trata de una solución problema que, por determinaciones previas, ha de llevarse por dilución a una concentración protéica dentro de los límites fijados por la curva standard. Esta ha de construirse cada vez que se efectúa una determinación, salvo que la reacción coloreada se lleve a cabo -standard y problema- a temperatura controlada de 30° C.

2.1.1.3.- Reactivos.

- Sol. madre (500 μ g/ml.) de albúmina sérica bovina, calidad Calbiochem.
- Sol.hija (50 μ g/ml.) de albúmina sérica bovina, calidad Calbiochem.
- Sol. alcalina de cobre.
- Sol. al 2% de CO_3Na_2 , calidad Merck p.a., en NaOH al 0.4%, calidad Merck p.a. - - - - - 50 ml.
- Sol. al 0.5% de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, calidad Merck p.a., en tartrato sódico. 2 H_2O al 1%, calidad Merck p.a. - - - - - 1 ml.

Es de preparación extemporánea.

- Reactivo de Folin - Ciocalteu.

Se utilizó el de calidad Analema, que en el momento de su uso se diluía al 1:1 con agua dest.

2.1.2.- Absorción específica a 422 nm.

Este método se basa en que los espectros de absorción de los ferredoxinas presentan un máximo de absorción en el visible a 422 nm. Así pues, conociendo el coeficiente de absorción molar a dicha longitud de onda, y supuesto que no existe ningún otro componente que absorba en la misma, será posible calcular la concentración de ferredoxina a partir de una simple lectura espectrofotométrica.

De lo dicho se desprende que el método no será válido en los estadios primarios del proceso de purificación, ni aún en aquéllos de purificación avanzada, dado el fuerte contenido de los extractos vegetales en pigmentos de diferente naturaleza. Nosotros lo hemos empleado exclusivamente a nivel de ferredoxina pura, como procedimiento habitual de determinar la concentración de ésta para ensayos ulteriores.

2.2.- Test de pureza por razón de absorbancias visible/ultravioleta.

Un primer índice de pureza de los preparados de ferredoxina se obtuvo por cálculo de los cocientes de absorción visible a 422 nm. y ultravioleta 274 nm.

La selección de estas longitudes de onda viene dada por el hecho de que el espectro de la ferredoxina oxidada de cloroplastos de hojas de espinaca presenta, entre otros, sendos máximos a 422 nm. y 274 nm. (ver Fig. 21), con una razón de absorbancias A_{422}/A_{274} de 0.49 para la ferredoxina totalmente purificada y de operatividad máxima. (41). La presencia de

proteínas extrañas implicaría, por la absorción genérica de - éstas al UV, una disminución de dicho cociente tanto más cuanto menor sea el grado de pureza del preparado de ferredoxina. En la práctica, y debido a la fácil desnaturalización de la ferredoxina, se considera suficiente a efectos bioquímicos una relación de absorción de 0.40.

Por lo que respecta a la ferredoxina de lechuga -y a tenor de los datos obtenidos con posteridad a partir de su espectro de absorción- se adoptó seguir un criterio paralelo al seguido para la ferredoxina de espinaca.

La determinación de absorciones se efectuó después - de cada fase del proceso de purificación, estando las ferredoxinas disueltas en el buffer determinado por cada paso -siempre buffer Tris-ClH pH 7.3, de fuerza iónica variable y, en cualquier caso, constantemente exento de absorción a las longitudes de onda indicadas-, y usando como blanco el mismo buffer e de dilución de la muestra. Se empleó un espectrofotómetro Perkin-Elmer, mod. 124, de doble haz, y cubetas de cuarzo de 10mm. de paso óptico.

2.3.- Test de homogeneidad por electroforesis en gel de poliacrilamida.

A lo largo del proceso de purificación se efectuaron ensayos de homogeneidad por electroforesis en disco en gel de poliacrilamida, siguiendo fundamentalmente la metodología de Ornstein y Davis (154) (155).

2.3.1.- Metodica.

Se utilizó gel tipo "Cyanogum 41" (relación acrilamida: bis 19/1), con un 15% de acrilamida y un 0.79% de

bis-acrilamida, en buffer Tris-ClH pH 8.9.

A 25 ml. de solución de gelificación-acrilamida, bis-acrilamida y un acelerador de polimerización, disueltos en el buffer antes indicado- mantenidos a 4° C, se agregó inmediatamente antes de su uso 1 ml. de la solución catalítica de persulfato, igualmente enfriado. El realizar ésta y las subsiguientes operaciones a baja temperatura resulta esencial cuando se manejan estas altas concentraciones de acrilamida y bis, para las cuales el tiempo de gelificación es extremadamente corto, prácticamente no más allá del imprescindible para proceder al llenado de los tubos.

El desarrollo se efectuó en tubos de 7.5 x 0.5 cm. de diámetro interior que, colocados verticalmente en un soporte adecuado, se llenaron rápidamente usando un pequeño estirón con la solución anterior, hasta un nivel distante aproximadamente 8 mm. del borde superior. Para evitar la formación de menisco sobre la superficie del gel, se dejan resbalar por las paredes de los tubos unas gotas del mismo buffer anterior; los geles quedan así de una longitud útil de 6.5 cm. Conseguida la gelificación se desecha la capa de buffer y se montan los tubos en la cubeta de electroforesis, cuyos compartimentos anódico y catódico se llenan con el buffer de electrodos pH 8.2. En estas condiciones de pH la mayoría de las fracciones protéicas -y entre ellas las ferredoxinas- se cargan negativamente, emigrando hacia el ánodo que se sitúa en el tanque inferior.

Las muestras llevadas al 10% en sacarosa se depositaron con la ayuda de una microjeringa sobre la superficie del gel, en volúmenes variables de 5 a 50 μ l. En cada recorrido uno de los 8 tubos que puede albergar el aparato se reservó para fijar el frente electroforético, usando para ello azul de bromofenol.

Los desarrollos se llevaron a cabo a 4º C, con un pre-recorrido a 1 mA por tubo de gel - 8 mA en total- durante 15 min. Posteriormente se hace pasar una corriente de 5 mA por gel - 40 mA en total- durante 100 min. más, tiempo que aproximadamente tarda el frente en situarse a 1 cm del extremo anódico. Pasado este tiempo se obtienen los geles rompiendo cuidadosamente el tubo de vidrio, ya que a esta alta concentración de acrilamida resulta imposible evacuar inalterados los geles respetando la integridad del tubo.

Se emplearon paralelamente dos tipos de tinción para la ferredoxina: inespecífica de proteínas con Negro de amido, y específica del hierro no hemínico presente en la molécula de ferredoxina (156).

Para la primera se sumergieron durante media hora los geles en solución de Negro de amido 10 B, decolorándose luego el fondo por lavado con agitación y flujo continuo de solución acética.

Para la tinción específica de hierro, el gel se sumerge inmediatamente después de la electroforesis en una solución de α, α -dipiridilo conteniendo ácido mercaptoacético. En 10 min. aparecen bandas rosas que corresponden al complejo del α, α -dipiridilo con el Fe^{2+} .

2.3.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 377 mM pH: 8.9

11.4137 g./250 ml. de Tris, calidad Merck p.a., ajustando a pH 8.9 con ClH conc., calidad Merck p.a.

- Sol. de gelificación.

Acrilamida, calidad BDH - - - - - 3.5720 g.

N,N-metilen-bis-acrilamida, calidad BDH - - 0.188 g.

Buffer Tris-ClH 377 mM pH 8.9 - - - - - c.s.p. 25 ml.
3-dimetilaminopropionitrilo, calidad BDH - - - - - 150 μ l.

Se filtra por papel y desgasa a vacío antes de usar.

- Sol. catalítica de persulfato.

Persulfato amónico, calidad Merck p.a., al 14% en buffer Tris-ClH 377 mM pH 8.9 Es de preparación extemporánea.

- Buffer de comportamientos anódico y catódico.

1.425 g./500 ml. de glicocola, calidad Merck p.a. Esta solución 38 mM de glicocola antes de enrasar se ajusta a pH 8.2 con buffer Tris-ClH 377 mM pH 8.9

- Sol. trazadora de azul bromofenol.

Azul de bromofenol, calidad Spinco-Beckman, al 0.01% en solución al 10% de sacarosa, calidad Merck p.a.

- Sol. de negro de amido.

Negro de amido, calidad Analema, a saturación aproximadamente 0.2% en acético al 7%.

- Sol. de decoloración.

Acido acético glacial, calidad Merck p.a., al 7% (v/v).

- Sol. reveladora de hierro.

~~α~~ -dipiridilo, calidad Merck p.a. - - - - - 0.7 g.

Acido mercaptoacético, calidad Sigma - - - - - 8 g.

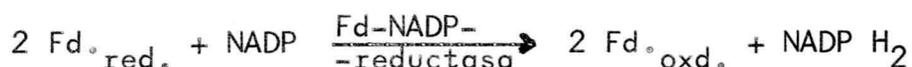
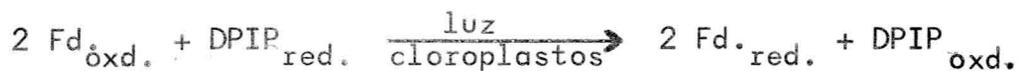
Agua dest. - - - - - c.p.s. 100 ml.

2.4.- Operatividad según el test de la ferredoxin-NADP-reductasa.

La actividad de los preparados finales de ferredoxinas de espinaca y lechuga se determinó midiendo la tasa de reducción del NADP por cloroplastos lisados y lavados de espina-

ca.

El ensayo se basa en la intervención de la ferredoxina reducida en la reducción del NADP por la ferredoxin-NADP-reductasa, según el esquema (41):



En la primera reacción, dependiente de la luz, la ferredoxina se reduce por intermedio del sistema fotoquímico del cloroplasto, actuando el par ascorbato- 2,6-diclorofenol-indofenol como donador de electrones. La ferredoxina reducida actúa en la segunda reacción como donador de hidrógeno en la reducción del NADP. Esta reacción es independiente de la luz y está catalizada por la ferredoxin-NADP-reductasa ligada al estroma del cloroplasto. La cantidad de NADPH originado es entonces proporcional a la ferredoxina presente, una vez estandarizados los restantes elementos del sistema.

2.4.1.- Metódica.

La reacción no precisa anaerobiosis, y se lleva a cabo en cubetas espectrofotométricas de cuarzo de 1 cm. de paso óptico, termostatzadas a 25° C mediante un portacubetas de dos plazas provisto de camisa de agua circulante mantenida a dicha temperatura; de esta forma se impide a la vez el calentamiento provocado por el sistema de iluminación. Esta se efectúa con dos lámparas incandescentes de 100 W mantenidas a ambos lados del portacubetas a una distancia de 5 cm. (Fig 2 y 3). Este sistema suministra una iluminación de unos 10.000 lux.

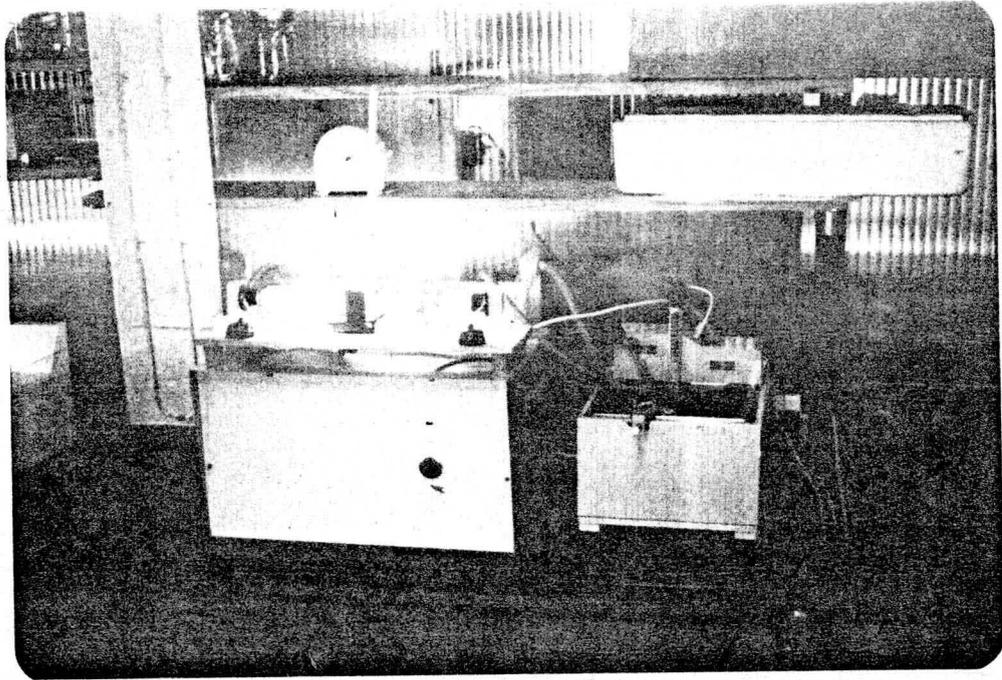


Fig. 2

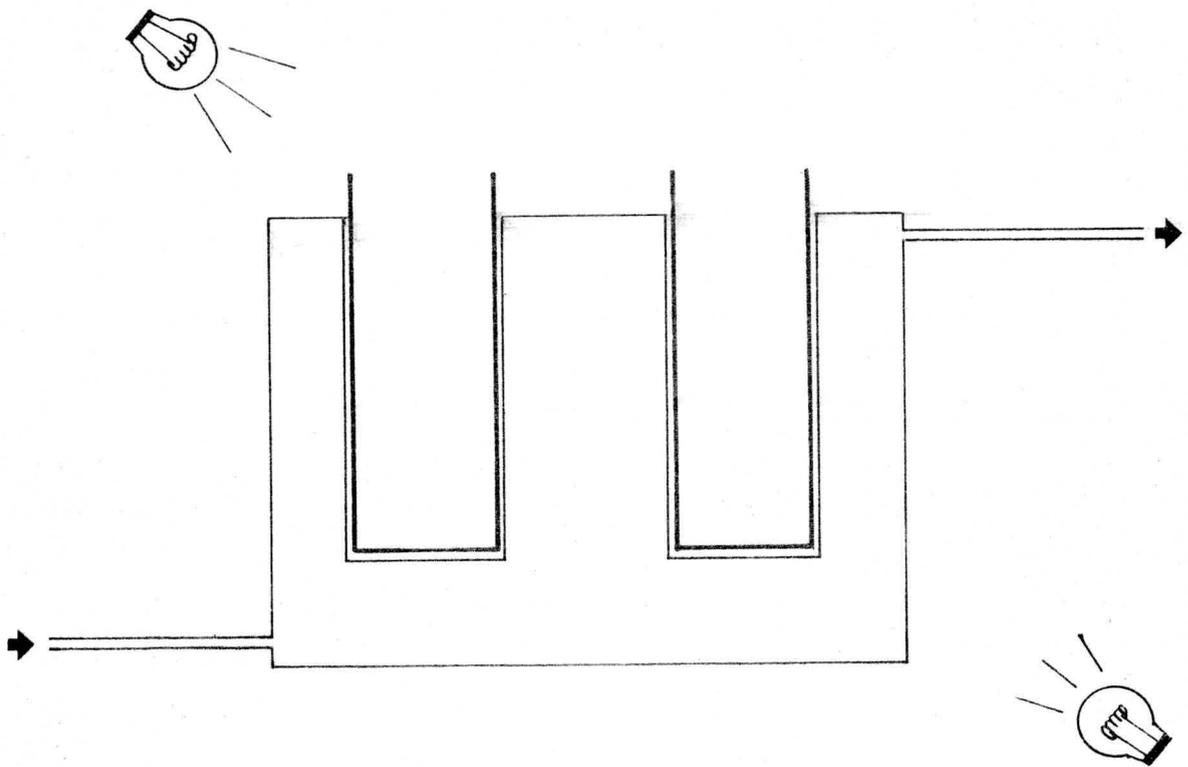


Fig. 3

La mezcla de reacción contiene:

Buffer Tris-ClH 1M pH 7.8	- - - - -	0.1 ml.
2,6-diclorofenolindofenol 2 mM	- - - - -	0.1 ml.
Ascorbato sódico 0.2 M	- - - - -	0.1 ml.
NADP 10 mM	- - - - -	0.1 ml.
Suspensión de cloroplastos	- - - - -	0.1 ml.
	equivalentes a 0.05 mg. de clo	rofila.
Sol. de ferredoxina	- - - - -	0.1 ml.
Todo en un volumen final de 3 ml.		

La reacción se inicia suministrando iluminación al tiempo cero. La tasa de reducción de NADP se determinó midiendo el incremento de absorbancia a 340 nm., efectuando lecturas de intervalos de iluminación de 3 min. en un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer, mod.124. Como blanco se utilizó una cubeta que contiene la mezcla de reacción completa, pero mantenida en la oscuridad.

En estas condiciones la reducción del NADP sigue una función lineal durante los primeros intervalos de medida, decreciendo después, siendo la pendiente inicial proporcional a la concentración de ferredoxina. Una unidad de ferredoxina es la que produce en las condiciones indicadas un incremento en la absorción de 1.0 al cabo de 10 min. de iluminación. Un incremento en la extinción de 0.1 equivale a la reducción de $0.048 \mu\text{M}$ de NADP (coeficiente de extinción molar= 6.22×10^6) independientemente del pH (31).

2.4.2.- Reactivos.

- Buffer Tris - ClH 1 M pH= 7.8
Tris 2 M (24.228 g./100 ml. de Tris, calidad Merck p.a.).

; ClH aprox. 2M (16.6 ml./100 ml. de ClH fumante = 1.19, calidad Merck p.a.)

Se ajusta al pH indicado un volumen de sol. de Tris con la solución clorhídrica y se lleva a un volumen doble con agua dest.

- Sol. 2 mM de 2,6 - diclorofenolindofenol.

5.8 mg./10 ml. de 2,6 - diclorofenolindofenol, calidad Sigma.

- Sol. de ascorbato sódico 0.2M .

39.6 mg./ml. de ascorbato sódico, calidad Sigma. Es de preparación extemporánea.

- Sol. de NADP 10 mM.

7.4 mg./ml. de NADP oxidado, sal disódica, calidad Boehringer.

- Suspensión de cloroplastos lisados: A

- - - - -

↙ A.- Suspensión de cloroplastos lisados.

Corresponde a la suspensión de partículas cloroplásticas C₁S₂ preparadas según Watley y col. (157).

A.1.- Metódica.

Como material de partida se utilizaron lotes de aproximadamente 200 g. de espinacas recién recolectadas. Eliminados los peciolo, las hojas se lavaron abundantemente con agua corriente y con agua dest. después y, una vez secas sobre papel de filtro, se mantuvieron unas horas a 4° C para que adquirieran turgencia. A continuación se cortaron en pequeños fragmentos, desechando las nerviaciones principales.

100 g. de hojas fragmentadas se homogeneizaron con 200 ml. de solución isotónica de ClNa a la que previamente se agregaron 20 ml. de buffer Tris-ClH pH = 8.0 y, adicionados además de ascorbato sódico como protector. Esto se efectuó en homogeneizador (Sorvall, Omnimixer) a velocidad tope durante 1-2 min. El homogenado obtenido se filtró a través de una doble capa de gasa de nylon, centrifugándose luego a 1100 r.p.m. (200 x g) durante 2 min. a 4° C (Sorvall Superspeed, RC2-B), a fin de separar restos celulares.

El sobrenadante se centrifugó ahora a 2500 r.p.m. (1000 x g) durante 7 min. en las mismas condiciones, suspendiéndose el sedimento de cloroplastos en 10 ml. de solución isotónica de ClNa adicionada de ascorbato; ésto se facilita arrastrando el sedimento con una varilla de vidrio provista de un trozo de goma blanca de Silicona en su extremo. A la suspensión obtenida se agregaron 90 ml. más de la solución de lavado anterior y, después de interponer bien, se centrifugó a 2500 r.p.m. (1000 x g) durante 10 min.

El sedimento de cloroplastos lavados se interpuso del mismo modo en 20 ml. de solución hipotónica de ClNa adicionados de ascorbato. Se agregaron 60 ml. más de la misma solución de lisis, y se centrifugó a 1200 r.p.m. (1800 x g) durante 10 min. desechándose el sobrenadante. El sedimento de cloroplastos rotos se interpuso en otros 20 ml. de solución de lisis y, una vez adicionados 60 ml. de la misma solución, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores de velocidad y tiempo.

Finalmente, el sedimento se interpuso en 20 ml. de solución hipotónica, diluyéndose después con la misma solución la concentración requerida de clorofila después de determinar ésta. Este preparado mantenido a 4° C es estable durante una semana.

A.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.2M pH 8.0

Tris 0.4 M (48.456 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.)

. 500 ml.

ClH aprox. 0.4M (32.2 ml./l. de ClH fumante $d=1.19$, calidad Merck p.a.)

. 292 ml.

Se ajusta a pH 8.0 con la solución clorhídrica, y se lleva a un litro con agua dest.

- Sol. isotónica de homogenización.

Sol. isotónica 0.35M de ClNa (20.47 g./l. de ClNa, calidad Merck p.a.)

. 200 ml.

- Buffer Tris-ClH 0.2M pH 8.0, 20 ml.

Hacer esta solución 0.01M en ascorbato (200 mg/100ml. de ascorbato sódico, calidad Sigma).

- Sol. isotónica de lavado.

Ascorbato 0.01M (200 mg/100 ml. de ascorbato sódico, calidad Sigma) en sol. isotónica 0.35M de ClNa (20.47 g/l. de ClNa, calidad Merck p.a.).

- Sol. hipotónica de lisis y lavado.

Ascorbato 0.01M (200 mg/100 ml. de ascorbato sódico, calidad Sigma) en sol. hipotónica 0.035M de ClNa (2.047 g/l. de ClNa, calidad Merck p.a.).

A.3.- Determinación de clorofila.

El contenido de clorofila de la suspensión de restos de cloroplastos se determinó según Arnon (158), de acuerdo con la siguiente metódica:

En una probeta de 50 ml. provista de tapón con esmeril se colocaron 0.5 ml. de la suspensión de cloroplastos, y -

se extrajo la clorofila por agitación con 20 ml. de acetona - (calidad Merck p.a.) y 4.5 ml. de agua. Se filtró rápidamente la solución y se midió la absorción del filtrado a 652 nm. en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, mod.124, frente a un blanco de acetona al 80%.

El contenido en clorofila de la suspensión de partículas cloroplásticas se obtiene a partir de la expresión:

$$\text{mg. Clorofila/ml.} = \frac{A_{652\text{nm}} \times 50}{34.5}$$

calculada sobre la base de un coeficiente de absorción específica (1 g./ml. en cubeta de 10 mm de paso óptico) a 652 nm -punto de intersección de los espectros de las clorofilas a y b- de 34.5×10^3 (158).

3.- Purificación.

Tanto la ferredoxina de espinaca como la de lechuga fueron purificadas siguiendo fundamentalmente el método descrito por Tagawa y Chain para la ferredoxina de espinaca (41), basado a su vez en el Tagawa y Arnon (9) para la de *Clostridium pasterianum*. Sobre dicho método se han introducido las siguientes modificaciones: en el segundo tratamiento con DEAE-celulosa -llamado por Tagawa y Chain fase cromatográfica - la elución de la ferredoxina se hizo por gradiente continuo de cloruro sódico, en lugar de hacerlo de una vez con una alta concentración de cloruros; además, después del tercer tratamiento sobre DEAE-celulosa -fase de concentración de dichos autores- se introdujo una filtración molecular por Sephadex G-75, ya que el preparado obtenido presentaba aún algún resto de impurezas.

En resumen, el método incluye los siguientes pasos:

- a) Precipitación acetónica de los extractos crudos de hojas entre los límites 35 y 80% de acetona.
- b) Adsorción sobre DEAE-celulosa.
- c) Cromatografía sobre columna de DEAE-celulosa.
- d) Concentración en DEAE-celulosa.
- e) Filtración molecular en columna de Sephadex G-75.

Finalmente, y como culminación del proceso de purificación, se efectuó la cristalización con sulfato amónico de la ferredoxina pura obtenida.

3.1.- Método.

A menos que se indique otra cosa, las condiciones en que se realizó la purificación fueron esencialmente las mismas para las dos ferredoxinas. Esto nos permitió hacer una evaluación de la validez del método, así como llevar un control comparativo del grado de purificación conseguido en cada paso.

Salvo la precipitación acetónica, efectuada a -20°C , todas las operaciones se realizaron en frío entre 0 y 4°C , en cámara refrigerada unas, y en baño de hielo otras. Por la misma razón todas las operaciones de centrifugación se efectuaron a 4°C , en una centrifuga Sorvall Superspeed, mod. RC2-B, en las condiciones que en cada caso se indican. Dada la inestabilidad de las ferredoxinas, durante todo el proceso el pH se mantuvo constante en el valor 7.3, empleando siempre el sistema buffer Tris-ClH.

Los fraccionados cromatográficos se efectuaron en columnas Jobling de las dimensiones que se indican, provistas de doble pistón y exentas, en consecuencia, de volumen muerto, en

flujo descendente y con impulsión mediante bomba peristáltica (Pharmacia P-3 o LKB Recycrom). El desarrollo de los procesos cromatográficos se siguió mediante medida continua de la absorción a 280 nm. de los eluidos de las columnas (LKB, Uvidord), en células de cuarzo de flujo continuo de 2 mm. de paso óptico, haciendo un ajuste previo con un blanco del buffer de base usado en el proceso.

Finalmente, los eluidos de las columnas de cromatografía se recogieron en fracciones de volumen variable en cada caso, utilizando un colector automático de fracciones (LKB, Ultrarac).

3.1.1.- Precipitación acetónica de los extractos crudos.

Los extractos crudos obtenidos a partir de los homogenados de hojas se dispusieron en un vaso de precipitados mantenido en mezcla frigorífica de hielo y sal; un agitador mecánico introducido en él, se puso en marcha simultáneamente a fin de evitar congelaciones. Inmediatamente, y con agitación continua, se añadió lentamente a un flujo aproximado de 10-15 ml./min. acetona, calidad Merck p.a., previamente enfriada a -20° C, en cantidad suficiente para conseguir una concentración final del 35%. Se detuvo la agitación y la suspensión obtenida se centrifugó a 3500 r.p.m. (2000 x g) durante 10 min.

Medido el volumen total de la solución sobrenadante, se pasó a otro recipiente análogo preenfriado en baño de hielo y sal, y se prosiguió la adición de acetona en análogas condiciones hasta alcanzar una concentración del 80%. Se detuvo la agitación y se dejó sedimentar el precipitado formado durante una hora.

La mayor parte de la solución sobrenadante puede ser entonces decantada sin que se remueva el sedimento; el resto - se eliminó centrifugando la suspensión a 3.500 r.p.m. (2000x g) durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y se procedió a eliminar la acetona embebida en el sedimento agitando éste en el mismo tubo de centrifuga con una varilla, al mismo tiempo que se hace llegar una corriente de aire frío mediante un secador de pelo. El proceso se puede dar por terminado cuando el sedimento adquiere una consistencia pulverulenta.

El material libre de acetona se extrajo con 85 ml. - de buffer Tris-ClH 0.01M, con agitación constante, durante 30 min. El material no soluble se eliminó por centrifugación a - 15000 r.p.m. (23.000 x g) durante 20 min., sometiéndose el sobrenadante a diálisis en membrana de celofán frente a buffer - Tris-ClH 0.005M, con agitación y flujo continuo de buffer, durante 15 horas.

El precipitado que aparece durante la diálisis se - eliminó por centrifugación a 12000 r.p.m. (15000 x g), durante 20 min. En tales circunstancias se obtiene una solución de intenso color rojo oscuro.

3.1.2.- Adsorción sobre DEAE-celulosa.

Al preparado anterior -aproximadamente 150 ml.- se agregó solución 5M de ClNa hasta conseguir una concentración final 0.2M en Cl⁻. La solución obtenida se pasó entonces a través de una columna (3.8 x 4 cm) de DEAE 23-celulosa, previamente equilibrada con buffer Tris-ClH 0.15M hecho 0.08M en ClNa, lo que corresponde a una concentración final 0.2M en Cl⁻. El flujo utilizado fué de 0.5 ml./min.

La ferredoxina quedará, junto con otros pigmentos, fijada cuantitativamente por el cambiador en la zona superior de

la columna, en forma de una franja ancha de color pardo oscuro. Se procedió entonces a arrastrar de la columna el material no fijado haciendo pasar un flujo de 1 ml./min. buffer de equilibración de la columna, hasta que se registró en el eluido una absorción a 280 nm. baja y constante, del orden de 0.1. Después de este lavado -aproximadamente unos 550 ml.- la banda roja que contiene la ferredoxina aparece por debajo de otra parduzca, situada en la capa superior del lecho de celulosa.

Se procedió entonces a una elución gradual de la ferredoxina con el mismo buffer Tris-ClH 0.15M, incrementando su concentración en Cl^- haciéndolo sucesivamente 0.11M y 0.14M en ClNa, lo que corresponde a concentraciones finales en Cl^- de 0.23M y 0.26M, respectivamente. De cada una de estas soluciones se emplearon 120 ml., a un flujo de 0.5 ml./min. En estas condiciones la banda roja correspondiente a la ferredoxina se desplaza poco a poco hacia la zona inferior de la columna, haciéndose entonces la elución definitiva con 40 ml. de buffer Tris-ClH 0.3M, 0.55M en ClNa, correspondiente a una concentración final en Cl^- 0.8M. Este rápido incremento de la fuerza iónica produce la elución inmediata de la ferredoxina, que se fue recogiendo en fracciones de pequeño volumen hasta que -por control continuo de la absorción a 280 nm - se comprobó que había sido desplazada del lecho del cambiador.

3.1.3.- Cromatografía sobre DEAE-celulosa.

El eluido del paso anterior -aproximadamente 35 ml.- se diluyó con 2.5 volúmenes de agua dest. y se hizo pasar a un flujo de 0.5 ml./min. a través de una columna (2.5 x 20 cm. para la ferredoxina de espinaca, y 2.5 x 30 cm. para la de lechuga) de DEAE 52-celulosa, equilibrada previamente con buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3 adicionado de ClH hasta

una concentración 0.20M en Cl^- . Igual que en el paso anterior la ferredoxina queda fijada en el extremo superior de la columna. La elución se realizó estableciendo un gradiente continuo y lineal de cloruro en buffer Tris-ClH 0.15M, entre las condiciones de equilibración 0.08M en ClNa y una concentración final 0.25M, correspondiente a 0.37M en Cl^- . Se utilizaron para establecer el gradiente 300 ml. de cada una de las soluciones, continuándose después la elución con la solución concentrada 0.25M, hasta que la banda correspondiente a la ferredoxina emergía de la columna. La elución se efectuó al mismo flujo anterior, recogiendo fracciones de 10 ml. y combinándose aquellas con razón de absorciones A 422 nm/A 274 nm superior a 0.2.

3.1.4.- Concentración sobre DEAE-celulosa.

El eluido anterior se diluyó con dos veces su volumen de agua dest. y se hizo pasar a un flujo de 0.5 ml./min. por una pequeña columna de 1cm de altura x 3cm de diámetro de DEAE-52 celulosa, previamente equilibrada como las anteriores en buffer Tris-ClH 0.15M, 0.08M en ClNa.

Toda la ferredoxina quedó fijada como una nítida banda roja en la zona más alta de la columna, de donde se eluyó al mismo flujo con Tris-ClH 0.3M, 0.55M en ClNa. De esta forma queda la ferredoxina recogida en un pequeño volumen entre 5 y 10 ml.

3.1.5.- Filtración por Sephadex G-75.

La solución concentrada del paso anterior se filtró a un flujo de 0.3 ml./min. por una columna (2.5 x 80 cm.) de Sephadex G-75, equilibrada con anterioridad en buffer Tris-ClH 0.01M pH 7.3 La elución se efectuó con el mismo buffer y flujo anteriores, recogiendo el eluido en fraccio--

nes de 10 ml.

Las fracciones que presentaron razones $A_{422\text{nm}}/A_{274\text{nm}}$ mayor de 0.4 se reunieron y dializaron durante una noche frente a buffer Tris-ClH 0.005M con agitación y flujo continuo con tinuo de buffer. Finalmente, dicho dializado, se liofilizó con servándose como tal hasta su utilización bajo atmósfera de ni trógeno a -10° C.

3.1.6.- Cristalización.

Se llevó a cabo en sulfato amónico, alcanzándose las condiciones críticas de concentración adecuadas - por diálisis en membrana de celofán (159).

Esencialmente el método consiste en sumergir en la solución precipitante adecuada -en este caso solución concentrada de sulfato amónico- una célula de diálisis que contiene la solución protéica a cristalizar. La concentración de sulfato amónico en el interior de la célula se va elevando gradualmente, hasta alcanzar el punto crítico en que se inicia la cristalización de la proteína.

Hay que indicar la inconveniencia de usar soluciones de agente cristalizante de concentración muy superior a la mí nima que ya inicia el proceso de cristalización, ya que se cum ple el principio de que cuanto menor es el grado de supersaturación menor es el número de cristales que se forman y mayor es el tamaño de éstos. Por ello lo más conveniente, si se des conoce el punto crítico, es iniciar el proceso con concentraciones no demasiado altas de sulfato amónico, e ir aumentando progresivamente éstas hasta aparición de opalescencia, en cuyo momento podemos considerar estamos en la situación óptima. Co mo células de difusión se emplearon tubos de vidrio de 10 x 0.5 cm. de diámetro interior, uno de cuyos extremos se cubrió

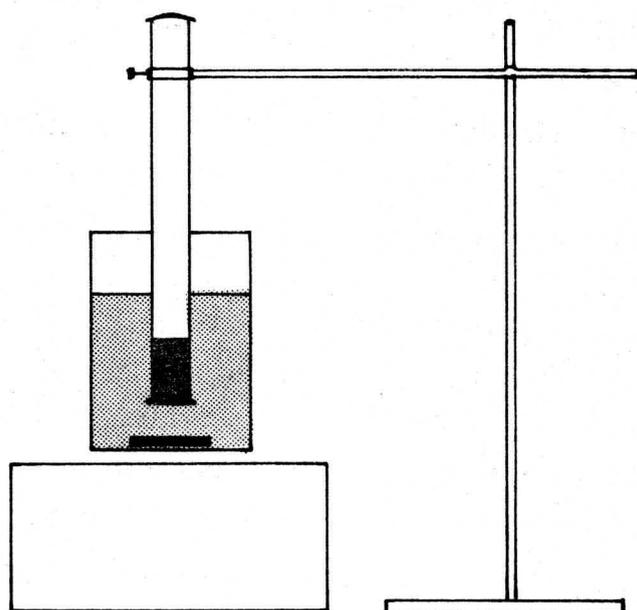


Fig. 4

con un trozo de membrana de celofán. Esta ha de hacer un cierre hermético, lo que se consigue aplicándola bien a las paredes del tubo con un aro elástico de goma de silicona, de unos 3 mm. de ancho. La célula, con su extremo cerrado hacia abajo, se dispuso verticalmente dentro de un pequeño vaso de precipitados, de tal forma que la membrana de celofán quede a una distancia de unos 2.5 cm. del fondo; en este espacio se sitúa la pieza de hierro teflonado de un agitador magnético, sobre el cual se dispone todo el conjunto, acelerándose así la difusión y reduciéndose el tiempo de consecución del equilibrio (Fig.4). El liofilizado de ferredoxina del paso anterior se disolvió en unos 0.5 ml. de agua dest. hasta obtener una solución concentrada de la misma. La solución se centrifugó en frío a 9000 r.p.m. (10000 x g) durante 15 min., para separar trazas de material no disuelto, y el sobrenadante se pasó, con la ayuda de un estirón, al interior de la célula evitando la presencia de burbujas sobre la membrana. Finalmente, se cerró el extremo superior del tubo con "Parafilm".

La célula se colocó en la posición antes indicada - en el interior del vaso, en el que previamente se había colocado, hasta una altura de 4 cm., solución de sulfato amónico al 80% de saturación a 4°C, iniciándose el proceso una vez puesto en marcha, de forma suave, el agitador. Es fundamental que no queden atrapadas burbujas por debajo de la membrana de celofán, lo que impediría una difusión libre. Pasadas 24 horas se sustituyó la solución al 80% de saturación por otra al 90% y, como a las 24 horas el interior de la célula permanecía prácticamente transparente, se hizo un nuevo cambio a una solución al 95% de saturación.

En estas condiciones, al cabo de 24 horas empieza a observarse un enturbiamiento en el interior de la célula, que es máximo a los 3 días, momento en que ya se manifiesta un aparente sedimento depositado sobre la membrana. Se pasó entonces, con

ayuda de un estirón, el contenido de la célula a un pequeño tubo de centrífuga, y se centrifugó en frío a 9.000 r.p.m. (10000 x g) durante 15 min. De esta forma se obtuvo un sedimento de cristales, que fueron visualizados con luz natural y polarizados a distintos aumentos en un microscopio ULTRAPHOT II POL (Carl Zeiss) provisto de cámara fotográfica CONTAFLEX.

La masa de material cristalizada se recogió y secó a vacío sobre papel Whatman nº1 en un pequeño filtro de Willstatter, conservándose con plena actividad bajo nitrógeno a -10° C,

3.2.- Reactivos.

Todos los sistemas buffers empleados a lo largo del proceso de purificación son Tris-ClH pH 7.3 de molaridad variable, y adicionados o no de cloruro sódico hasta la concentración final en cloruros adecuada. Se prepararon por dilución de una solución madre Tris-ClH 0.3M, haciendo luego, si es necesario, un ajuste a pH 7.3 con solución de Tris o clorhídrica. Para los ajustes posteriores en cloruro hay que tener en cuenta que esta solución 0.3M es de 0.24M en Cl⁻.

- Buffer Tris-ClH 0.30M pH 7.3.

Tris 0.6M (72.648 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.)

. 500 ml.

ClH aprox. 0.6M (49.8 ml./l. de ClH fumante d=1.19, calidad Merck p.a.) 370 ml.

Se ajusta el pH con la solución clorhídrica, y se lleva a ll. con agua dest.

- Buffer Tris-ClH 0.01M pH 7.3.

Se prepara por dilución al 1/30 del buffer 0.3M.

- Buffer Tris-ClH 0.005M pH 7.3.

Se prepara diluyendo al 1/60 el buffer 0.3M.

-Sol. 5M de ClNa.

292.5 g./l. de ClNa, calidad Merck p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3, 0.20M en Cl^- .

Diluir al 1/2 el buffer 0.3M y disolver 4.68 g./l. de ClNa, calidad Merck p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3, 0.23M en Cl^- .

Diluir al 1/2 el buffer 0.3M y disolver 6.435 g./l. de ClNa, calidad Merck p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3, 0.26M en Cl^- .

Diluir al 1/2 el buffer 0.3M y disolver 8.190 g/l de ClNa, ca lidad Merck p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.3M pH 7.3, 0.8M en Cl^- .

32.76 g./l. de ClNa, calidad Merck p.a., en el buffer indica do.

- Buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3, 0.37M en Cl^- .

14.6 g./l. de ClNa, calidad Merck p.a., en el buffer indicado.

- Sol. de sulfato amónico al 80% de satura ción a 4º C.

Preparar una solución sobresaturada a 4º C disolviendo 72.5 g. de sulfato amónico, calidad Merck p.a., en 100 ml. de agua dest. mantenida a dicha temperatura; dejar reposar la solución durante una noche en cámara frigorífica a 4º C. Alcanzada la saturación - deben quedar aún cristales de sulfato amónico sin disolver.

La solución saturada al 80% se prepara a partir de ésta diluyéndola con agua dest. a 4º C, en la proporción 4:1 v/v.

- Sol. de sulfato amónico al 90% de saturación a 4º C.

Se prepara a partir de la sobresaturada anterior por dilución con agua dest. a 4º C en la proporción 9:1 v/v.

- Sol. de sulfato amónico al 95% de satura ción a 4º C.

A partir de la sobresaturada anterior diluyéndola con agua dest. a 4º C, en la proporción 19:1 v/v.

- Preparación de DEAE 23-celulosa equilibrada en buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3, 0.08M en ClNa (0.20 M en Cl⁻).

Se utilizó DEAE 23-celulosa fibrosa y exenta de "fines", calidad Watman. La cantidad a tratar se deducirá sobre la base de que por cada ml. de lecho se necesitan, aproximadamente, 0.15 g. de cambiador seco.

Suspender la cantidad necesaria en 15 partes (p/v) de ClH 0.5N, manteniendo el conjunto bien mezclado con agitador magnético durante 1 hora a la temperatura ambiente. Esta suspensión se pasa a un filtro Buchner preparado con papel Schleircher-Schüll 2043 b, y se escurre a vacío, lavándose a continuación con agua dest. abundante hasta que los filtrados den un pH alrededor de 4. Suspender ahora el cambiador en 15 partes (p/v) de NaOH 0.5N, y mantener con agitación durante 30 min.; decantar el sobrenadante y suspender de nuevo, en condiciones análogas, con otras 15 partes de álcali. Se pasa la suspensión a un filtro Buchner igual al anterior, se escurre a vacío y se lava abundantemente con agua dest. hasta pH próximo a la neutralidad.

El equilibrado se inicia suspendiendo la DEAE-celulosa así tratada en volumen suficiente de buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3, 0.08M en ClNa, con agitación durante 15 min. Decantar el sobrenadante y repetir el tratamiento varias veces hasta que el sobrenadante tenga el mismo pH que el buffer de equilibrio. Normalmente cinco tratamientos de este tipo son suficientes para ello, mientras que las sucesivas decantaciones permiten, además, eliminar los "fines" que se hayan podido originar

durante las fases de agitación. Un desgasado final a un vacío, con agitación, de 50 mm. de Hg hasta que no se desprendan burbujas, deja la suspensión del cambiador lista para proceder al llenado de las columnas. Este cambiador se usó una sola vez, ya que por tratarse de uno de los primeros pasos del proceso de purificación, quedaba muy contaminado con material orgánico difícilmente lavable.

- Preparación de DEAE 52-celulosa equilibrado en buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3, 0.08M en ClNa (0.2M en Cl⁻).

Se empleó DEAE 52-celulosa microgranular y prehumedecida, calidad Watman, que, a causa de no haber sufrido ningún proceso de secado durante su elaboración ésta, por un lado, exenta de "fines" y, por otro, no necesita previo tratamiento de reciclado. La cantidad a emplear en cada caso viene definida porque un ml. de lecho necesita, aproximadamente, 0.7 g. de cambiador. Por lo demás, el proceso de equilibrado se lleva a cabo de forma análoga a lo descrito para el tipo DEAE-23. Este cambiador se usó repetidas veces sometiéndolo, una vez evacuado de la columna, a un proceso de reciclado y equilibrado según se describe anteriormente.

- Preparación de Sephadex G-75 equilibrado en buffer Tris-ClH 0.01M pH 7.3 .

Hemos utilizado Sephadex G-75 normal, calidad Pharmacia (Uppsala), un gramo del cual suministra, una vez hinchado, de 12 a 15 ml. de lecho. Para el hinchado y equilibrado se suspende la cantidad necesaria de Sephadex en 10-12 veces (p/v) del buffer indicado, y se lleva a baño maría con agitación durante 3 horas. Pasado este tiempo se deja enfriar, se desgasa a vacío hasta que no desprenden burbujas, y se procede al llenado de la columna.

II.- CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LAS FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.

Como se dijo anteriormente, ambas ferredoxinas han sido estudiadas en paralelo a título comparativo, y como test de validez de las técnicas utilizadas, a la luz de las propiedades profusamente descritas de la ferredoxina de espinaca.

1.- Espectro de absorción visible-UV.

Se llevaron a cabo en un espectrofotómetro de doble haz visible-UV, Perkin-Elmer, mod. 124, provisto de lámpara de tungsteno para el visible y de deuterio para el ultravioleta, con un rango de longitudes de onda entre 220 y 700 nm., y cambio de lámpara a 370 nm. La anchura de la ventana espectral fué de 1 nm., y la velocidad de barrido de 60 nm/min. en el sentido de mayor a menor longitud de onda.

Hemos utilizado cubetas espectrofotométricas de Suprasil para UV lejano, con prácticamente nula absorción hasta 220 nm., de 10 mm. de paso óptico. El espectro fué recogido en un registrador potenciométrico de 10 mV, con 24 cm. de ancho de carta utilizando velocidades de registro de 20 mm/min., o de 60 mm/min. para matizar detalles. Con el mismo fin se utilizó a veces una ampliación de escala x 2.

Las soluciones de ferredoxina de espinaca y lechuga se prepararon por disolución en agua dest. de los liofilizados respectivos, hasta una concentración correspondiente a una lectura a 422 nm. del orden de 0.5 unidades de absorción. Como blanco se utilizó siempre agua dest.

El espectro de las ferredoxinas reducidas se obtuvo

por reducción total de las mismas con un ligero exceso de ditionito sódico, en anaerobiosis en cubeta Thumberg. Por sucesivas admisiones de aire en la cubeta se obtuvieron situaciones de reducción parcial, hasta recuperación total de la forma oxidada de partida. La metódica seguida se describe con detalle en el epígrafe 4.1.2. de la determinación del potencial de óxido-reducción.

Una reducción total de tipo irreversible se consiguió en las mismas condiciones anteriores aumentando a $25 \mu\text{l.}$ el volumen de solución 0.1M de ditionito. En cada una de estas situaciones se efectuó un registro de la zona visible del espectro, calculándose para la situación de total reducción, reversible, el porcentaje de pérdida de extinción de los máximos espectrales.

2.- Coefficiente de absorción molar.

Independientemente del valor intrínseco de esta constante como dato caracterizador de las ferredoxinas, la hemos sistemáticamente utilizado como elemento controlador de la concentración de material empleada en cada determinación. Este dato resultaba difícilmente mensurable por simple pesada del material sólido liofilizado, dada la escasez de éste y la pequeña cantidad utilizada en cada ensayo, por un lado, y la higroscopicidad de los liofilizados, por otro.

La determinación se ha hecho a 274 y 422 nm. , longitudes de onda, clásicamente utilizadas para las ferredoxinas - por presentar en esa zona sendos máximos de absorción.

2.1.- Metódica.

Se emplearon para la determinación sendos lotes de ferredoxinas de espinaca y lechuga disueltas en buffer Tris - ClH 0.005M pH 7.3, procedentes del último paso del proceso de purificación y, en consecuencia, totalmente exentas de cualquier impureza. En ellas se determinó con toda rigurosidad las absorciones a 422 y 274 nm. en cubetas de cuarzo de 1 cm. de paso óptico, utilizando como blanco el mismo buffer de disolución.

Alícuotas de estas soluciones exactamente medidas - del orden de 40-50 ml. en razón a su contenido en ferredoxina - se concentraron por liofilización en matraces de rotavapor, transvasándose entonces cuantitativamente el contenido por repetidos lavados con agua dest. a pequeños tubos de liofilización previamente ~~tarados~~ tarados con exactitud. Se volvió a liofilizar pesándose de nuevo y obteniéndose por diferencia la cantidad de material seco liofilizado. Deduciendo de este valor el peso de buffer Tris-ClH correspondiente al volumen de partida, se obtuvo la cantidad de ferredoxina disuelta en él.

El peso de Tris-ClH se calculó sobre la base que 1 ml. de buffer 0.005M pH 7.3 contiene 0.75 mg. de material sólido tamponante.

El coeficiente de absorción molar vendrá dado por la expresión:

$$\epsilon_{\lambda} = \frac{A_{\lambda} \times V \times PM}{1000 \times p} \quad M^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

ϵ_{λ} = coeficiente de absorción molar a la longitud de onda λ .

V = volumen de partida de la solución de ferredoxina (en ml.)

p = peso de ferredoxina en el volumen V (en gramos).

A_{λ} = absorción de la solución de partida a la longitud de onda λ

PM = peso molecular de la ferredoxina.

3.- Determinación del punto isoeléctrico.

El punto isoeléctrico de las ferredoxinas se determinó utilizando la técnica de electroenfoque en gradiente de densidad (160), modificada a nivel de micrométodo por Behnke y col. (161).

Se llama electroenfoque al proceso que tiene lugar cuando una molécula cargada se somete a un campo eléctrico en un medio en el que previamente se ha establecido un gradiente de pH. Una proteína incluida en ese medio, y que tenga un punto isoeléctrico comprendido entre los límites del gradiente, - adquirirá una carga que provocará su emigración y localización final en la zona de su pH isoeléctrico.

El gradiente de pH se consigue con las llamadas "anfolinas", constituidas por mezcla de diferentes ácidos alifáticos poliamino - poliacarboxílicos, de bajo molecular y gran difusibilidad, con puntos isoeléctricos distintos y próximos, de tal forma que dibujan un espectro continuo de pH entre límites pre seleccionados. Al principio del desarrollo electroforético se encuentran todos mezclados, definiendo el pH medio de la mezcla; pero gracias a su gran difusibilidad, al poco tiempo de pasar - la corriente, cada molécula habrá emigrado según su pK hasta al canzar una posición determinada, estableciéndose un gradiente de pH entre los límites requeridos.

Por supuesto que el margen de pH seleccionado habrá de englobar al valor de punto isoeléctrico de la sustancia a - testar, y en el caso de que se desconozca será necesario efec-

tuar ensayos previos con anfolinas de amplio margen. Cuanto más estrecho sea éste con más exactitud quedará definido el punto isoeléctrico de la sustancia ensayada, pero en contrapartida más tiempo y condiciones más drásticas de voltaje requerirá la focalización, lo que en el caso de sustancias lábiles, como las ferredoxinas, representa un gran inconveniente.

En el electroenfoque en gradiente de densidad, el proceso de electroforesis se realiza en medio líquido, y la estabilización anticonvectiva, en la columna en que se desarrolla el proceso, se consigue estableciendo un gradiente de sacarosa, de concentración creciente desde el extremo superior al inferior de dicha columna.

En la práctica el gradiente que se establece es lineal, lo que se consigue mediante un dispositivo de mezcla continua de las soluciones que definen los límites inferior y superior de concentración de sacarosa. A estas soluciones se incorporan, además, las anfolinas y, frecuentemente también, la muestra a ensayar. Con el gradiente formado se van llenando las columnas de desarrollo, que en la microtécnica utilizada, son pequeños tubos de vidrio de 8 mm. de diámetro y 15 cm. de longitud, lo que permite economizar muestra y, simultáneamente, disminuir el período de desarrollo.

Por otro lado, para proteger las anfolinas y la muestra del contacto directo con los electrodos, que puede producir una oxidación en el ánodo y una reducción en el cátodo, se interponen entre éstos y el contenido de la columna las llamadas "soluciones de electrodos": un ácido y un álcali diluïdos, en el ánodo y cátodo, respectivamente. Finalmente, como soporte de la vena líquida de los tubos se utiliza una zona semiporosa de poliacrilamida, que para mayor consistencia se hace ge

lificar en un ensanchamiento en bola de la parte inferior de los tubos.

Los desarrollos se efectuaron en una cubeta clásica de electroforesis "en disco" de poliacrilamida, capaz de albergar 8 tubos, con el ánodo en la parte inferior y el cátodo en la superior.

3.1.- Metodica.

Colocados los tubos en posición vertical, y cerrados los extremos inferiores con un trozo de "Parafilm", se llenó el bulbo inferior con la solución gelificante, hasta una altura aproximada de 20 mm.

Cuando se ha conseguido una gelificación completa - unas dos horas- se retira el parafilm y se procede a equilibrar el gel frente a la solución ácida anódica del electrodo inferior de la cubeta, llenando el tubo y manteniendo su extremo inferior sumergido en la misma.

De este modo al cabo de una noche queda asegurada la conductividad a través del gel.

Se evacua la solución anódica de los tubos y se lavan éstos repetidamente con agua dest. hasta la eliminación de la acidez y, vueltos a colocar en posición vertical, se procede a llenarlos con la solución gradiente de sacarosa, conteniendo anfolinas con margen de pH 3.5 - 10 y la muestra de ferredoxina. Para ello se dispusieron en el dispositivo mezclador (Fig.5) - 2.8 ml. de las soluciones ligera y densa, con la ferredoxina incorporada a la primera y las anfolinas a ambas; de esta forma se consigue un volumen final de 5.6 ml., suficiente para el llenado de la columna, quedando una altura libre de 1 cm. en la parte superior. La concentración de anfolinas final resulta ser de 2.1%, suficiente para una buena definición de pH, quedan

do el gradiente de sacarosa establecido aproximadamente entre las concentraciones 10 y 35%, la cantidad de muestra incorporada fué de 0.5 ml. de una solución que dió una $A_{422 \text{ nm.}} = 1.5$. Esta operación se efectuó a 4º C, con las soluciones previamente enfriadas a dicha temperatura.

Los tubos de desarrollo se montaron cuidadosamente en la cubeta de electroforesis, en la que se dispuso en el tanque inferior la solución anódica ácida, y en el superior la catódica alcalina, teniendo especial cuidado con esta última de no alterar la superficie del gradiente de sacarosa creado en el interior de los tubos. El desarrollo electroforético se efectuó a 4º C, con una tensión de 200 V, lo que en los momentos iniciales representa un paso de corriente de 2 mA por tubo, valor que va disminuyendo progresivamente con el tiempo, hasta casi llegar a anularse al final del proceso. La focalización de la ferredoxina en una banda más o menos nítida es aparente a simple vista, y se consigue al cabo de unas 4-5 horas; sin embargo, parte del material se desnaturaliza durante el proceso, quedando distribuido por la columna en forma de bandas algodonosas.

Una vez desconectados los electrodos y retirada la solución del tanque superior, se dispusieron cuidadosamente las columnas en un soporte vertical, procediéndose inmediatamente a la elución perforando el gel con una aguja hipodérmica conectada a un tubo capilar de teflón. Esta operación hay que efectuarla con sumo cuidado, pero rápidamente, ya que una vez detenido el paso de corriente, las bandas focalizadas tienden a difundirse, mientras que el material insolubilizado empieza a flocular distorsionando el focalizado en zonas inferiores.

La elución se realizó a un flujo de 0.4 ml./min. -

por medio de una bomba peristáltica (Pharmacia, Uppsala), reco-
giéndose fracciones de 0.4 ml. Diluidas éstas a un volumen final
de 0.8 ml. con agua dest. se efectuó la lectura espectrofotomé-
trica a 422 nm. para la localización de la ferredoxina, mientras
que el pH de cada fracción se determinó por lectura al pH-metro
a la misma temperatura a la que se efectuó la focalización elec-
troforética.

Los valores de pH se dispusieron en las ordenadas -
de un sistema coordinado, frente a los correspondientes volúme-
nes de elución en abscisas, calculándose, con la serie de pares de
valores, la recta de regresión. Por interpolación en ésta del -
volumen de elución de las ferredoxinas se determinaron los pun-
tos isoeléctricos de las mismas.

3.2.- Reactivos.

- Sol. de acrilamida-bis-acrilamida, razón
41/1.

Disolver 3 g. de acrilamida, calidad BDH, y 0.0734 g. de
bis-acrilamida, calidad BDH., en agua dest. hasta un volu-
men final de 10 ml.

- Sol. aceleradora de la polimerización.

Llevar 50 l. de dimetilamino-propionitrilo, calidad BDH, a
10 ml. con agua dest.

- Sol. catalítica.

14 mg. de persulfato amónico, calidad BDH, se disuelven en
agua dest. hasta un volumen final de 10 ml. Preparar cada
vez.

- Preparación del gel al 7.5% de acrilami-
da.

Mezclar los siguientes reactivos:

Sol. acrilamida-bis (41/1) 2 ml.
Sol. aceleradora de polimerización 1 ml.
Agua dest. 1 ml.

Desgasar al vacío y, entonces, agregar:

Sol. catalítica 4 ml.

- Sol. del electrodo anódico.

Acido fosfórico del 85% d= 1.70, calidad Riedel p.a., al 3% (v/v).

- Sol. del electrodo catódico.

Trietanolamina, calidad Merck p.a., al 3% (v/v).

- Sol. ligera de anfolinas y sacarosa (10.7%).

Disolver los siguientes reactivos:

Anfolinas al 40% rango de pH 3.5-10, calidad LKB. . 0.25ml .

Agua dest. 2.15ml

Sacarosa, calidad Merck para gradientes. 0.3 g.

Agregando entonces 0.5 ml. de la solución de ferredoxina a testar, se obtiene un volumen final de 2.8 ml.

- Sol. densa de anfolinas y sacarosa (35.7%)

Disolver los siguientes reactivos:

Anfolinas al 40% rango de pH 3.5-10, calidad LKB. . 0.25ml.

Agua dest. 0.85ml.

Sacarosa, calidad Merck para gradientes 1.0 g.

Se obtiene así un volumen de 2.8 ml. de solución.

4.- Potencial de óxido-reducción.

Los potenciales redox de las ferredoxinas se determi

naron por comparación con el del colorante metilviológico, según el método de Vetter y Knappe (162), modificado para este tipo de compuestos por Yoch y Arnon (86).

El método se basa en que, en condiciones comunes de pH compatibles con su estabilidad, la reacción entre dos sistemas redox distintos evoluciona hasta alcanzar un estado de equilibrio en el cual ambos han adquirido el mismo potencial. Para los sistemas metilviológico y ferredoxina el valor de este potencial vendrá dado por las expresiones:

$$E = E_o + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[MV_{\text{oxd.}}]}{[MV_{\text{red.}}]}$$

$$E = E'_o + \frac{RT}{n'F} \ln \frac{[Feredox_{\text{oxd.}}]}{[Feredox_{\text{red.}}]}$$

en las que:

E = potencial de ambos sistemas en la situación de equilibrio.

E_o = potencial redox biológico normal del sistema metilviológico, que al pH 7.7 de la experiencia es -446 mV (162).

R = constante general de los gases.

T = temperatura, en grados absolutos, en que se verifica la experiencia, y que en nuestro caso fué de 25° C.

n = cambio de valencia para el sistema MV_{oxd.} - MV_{red.}, igual a 1.

n' = cambio de valencia para el sistema Feredox_{oxd.} - Feredox_{red.}, admitido ser igual a 1 para todas las ferredoxinas descritas hasta el momento (6).

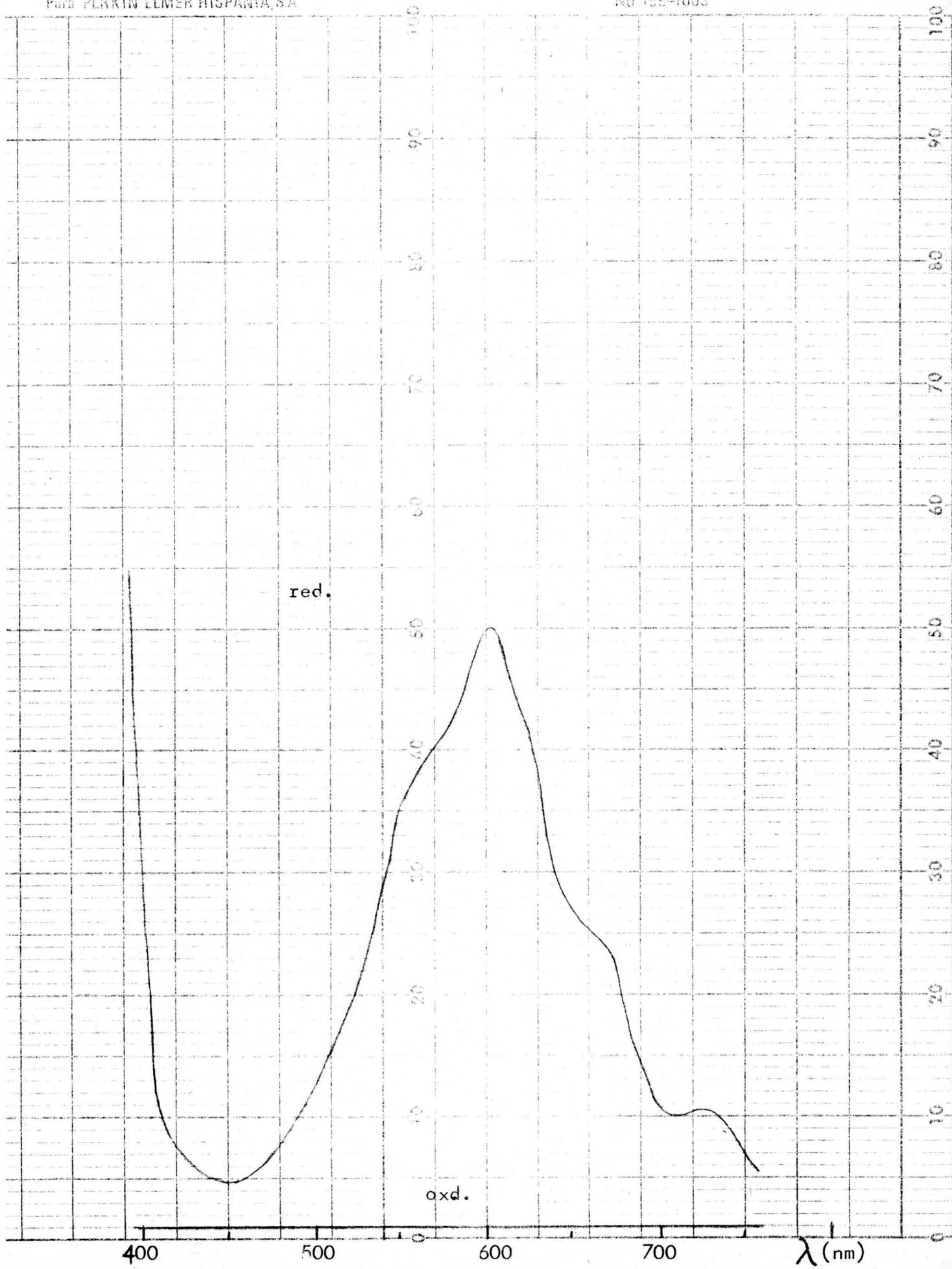


Fig. 6

F = número de Faraday.

$[MV_{\text{oxd.}}]$ y $[MV_{\text{red.}}]$ = concentraciones de metilviológeno oxidado y reducido en la situación de equilibrio.

$[Ferred_{\text{oxd.}}]$ y $[Ferred_{\text{red.}}]$ = concentraciones de ferredoxina - oxidada y reducida en la situación de equilibrio.

E'_0 = potencial biológico normal de la ferredoxina, a determinar.

En la situación de equilibrio se cumplirá:

$$-0.446 + \frac{RT}{F} \ln \frac{[MV_{\text{oxd.}}]}{[MV_{\text{red.}}]} = E'_0 + \frac{RT}{F} \ln \frac{[Ferred_{\text{oxd.}}]}{[Ferred_{\text{red.}}]}$$

expresión que finalmente queda en la siguiente forma:

$$E'_0 = -0.446 + \frac{RT}{F} \ln \frac{[MV_{\text{oxd.}}][Ferred_{\text{red.}}]}{[MV_{\text{red.}}][Ferred_{\text{oxd.}}]} \quad [I]$$

En la práctica, una mezcla aproximadamente equimolecular de metilviológeno y ferredoxina se somete en atmósfera anaerobia a una reducción total con ditionito, reoxidándose después paso a paso por repetidas admisiones de aire. Es fundamental emplear sólo un pequeño exceso de ditionito, ya que concentraciones altas de éste pueden inducir una drástica reducción, con desorganización irreversible de la molécula de ferredoxina. Después de cada admisión, y previo un período de equilibrio, se determinan las concentraciones de las formas oxidadas y reducidas del colorante y ferredoxina. Esto se consigue basándose en que el metilviológeno oxidado no presenta absorción en el visible, mientras que en forma reducida muestra un máximo a 740 nm. (Fig.6), longitud de onda a la cual la ferredoxina

en cualquiera de las formas presenta una absorción despreciable. Por otro lado, la ferredoxina oxidada presenta un máximo a 422 nm., que desaparece al pasar a forma reducida. En conjunto, el proceso conlleva los siguientes pasos previos:

- a) Determinación de la razón de absorbancias A_{740}/A_{422} para el metilviológico reducido.
- b) Determinación de la diferencia de absorciones a 422 nm. entre las formas completamente oxidada y reducida de la ferredoxina, por unidad de absorción de la forma oxidada:

$$F = \frac{A_{\text{ferred.oxd.}} - A_{\text{ferred.red.}}}{A_{\text{ferred.oxd.}}}$$

Además, una vez preparada la mezcla de reacción:

- c) Determinación de la absorción de la ferredoxina oxidada a 422 nm.

Y una vez alcanzada la situación de equilibrio:

- d) Dosificación de la concentración de metilviológico reducido por lectura espectrofotométrica a 740 nm.
- e) Cálculo a partir del factor obtenido en el epígrafe (a), de la absorción a 422 nm. correspondiente al valor obtenido en el apartado anterior.
- f) Determinación de la absorción a 422 nm. de la mezcla en equilibrio.
- g) Deducción del valor anterior, del correspondiente al metilviológico reducido, calculado según se indica en el epígrafe (e).
- h) Cálculo del valor f del epígrafe (b) para la situación de equilibrio, usando los valores de absorción a 422 nm. de la ferredoxina totalmente oxidada -suministrado por la lectura

indicada en el epígrafe (c)-, y de la ferredoxina en situación de equilibrio obtenido en el epígrafe (g).

- i) Cómputo del tanto por ciento de ferredocina oxidada y reducida a partir de los valores F y f calculados anteriormente.

4.1.- Metódica.

Analícemos rápidamente el proceso experimental de los pasos anteriores:

4.1.1.- Determinación de la razón de absorciones A_{740}/A_{422} del metilviológeno reducido.

Se usó una solución 0.1 mM de metilviológeno en buffer Tris-ClH pH 7.7, condiciones análogas a las que luego se utilizarán en la determinación del potencial redox. De ella se colocaron 1.5 ml. en el **compartimento** principal de una cubeta anaeróbica tipo Thumberg de 10 mm. de paso óptico, a cuya tubuladura lateral se adaptó un trozo de 4 cm de goma virgen de vacío. Se colocaron luego 10 μ l. de solución reductora de ditionito en el depósito lateral, y se llevó el conjunto a congelar a -12° C en el **compartimento** congelador del frigorífico.

En estas condiciones se puede efectuar a través de la goma lateral un vacío del orden de 10 micrones, alcanzado el cual se selló la cubeta cerrando la goma con una buena pinza de Hoffman. Se descongeló el conjunto por inmersión del cuerpo principal de la cubeta en baño termostatzado a 25° C y, una vez alcanzada ~~esta temperatura~~ se procedió a mezclar por inversión el contenido de ambos **compartimentos**. Inmediatamente la masa líquida toma una coloración azul-violeta, determinándose una vez transcurridos 10 min. los valores de absorción a 740 y 422 nm. frente a un blanco de la solución buffer de disolución

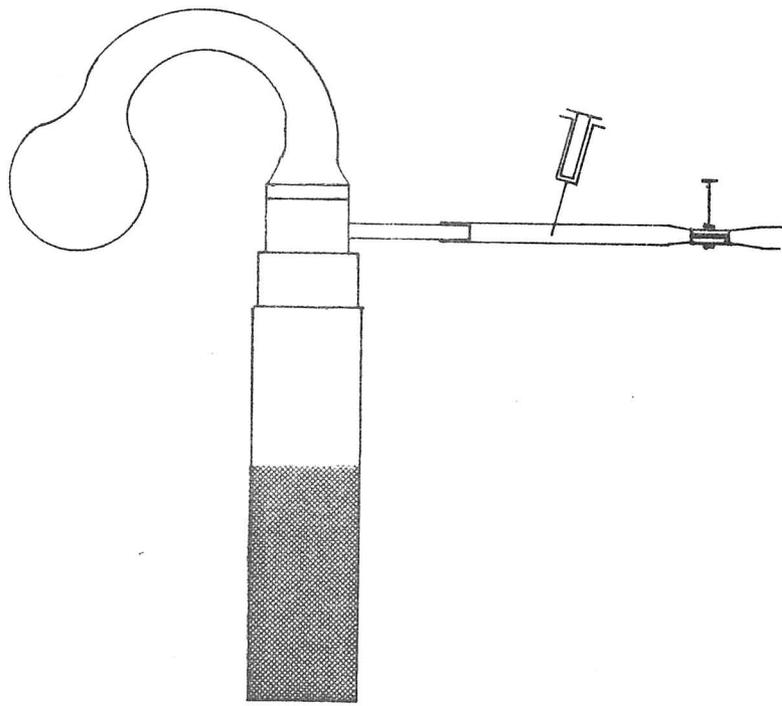


Fig. 7

del metilviológeno.

Se procedió entonces a sucesivas admisiones de alícuotas de 25 μ l. de aire, por inyección con microjeringa a través de la goma de vacío (Fig. 7); después de cada admisión se agitó el contenido de la cubeta y, pasados 10 min. de equilibrio, se volvieron a efectuar las lecturas de absorción a 740 y 422 nm. El proceso se repitió hasta total decoloración de la solución, obteniéndose en cada caso la razón A_{740}/A_{422} . Como valor a usar de la misma se utilizó la media de todas las determinaciones.

4.1.2.- Cálculo de la diferencia de absorciones a 422 nm. de las formas oxidada y reducida, - por unidad de absorción de la forma oxidada de ferredoxina.

Se prepararon soluciones de ferredoxina - por disolución de los liofilizados en buffer Tris-ClH pH 7.7 - hasta una absorción a 422 del orden de 0.95-1.00, lo que, de acuerdo con los coeficientes molares de extinción, representa una concentración aproximadamente 0.1 mM. De ellas se colocaron 1.5 ml. en el compartimento principal de una cubeta Thumberg, efectuándose una lectura exacta de la absorción a 422 nm. frente a un blanco de buffer Tris-ClH. Se colocaron entonces 10 μ l. de la solución de ditionito en el compartimento lateral y, una vez congelado, hecho el vacío y mezclado el contenido de ambos compartimentos según se describe anteriormente, se efectuó una lectura a 422 nm. de la solución decolorada, totalmente reducida, de ferredoxina.

Después de admisiones sucesivas de aire como se describe para el metilviológeno, se volvieron a efectuar nuevas lecturas a la misma longitud de onda, hasta recuperar la absor

ción de la solución inicial de ferredoxina oxidada. Finalmente, se determinó el valor F para el estado total de reducción:

$$F = \frac{A_{\text{ferred.oxd.}} - A_{\text{ferred.red.}}}{A_{\text{ferred.oxd.}}}$$

Los valores de F correspondientes a las sucesivas admisiones de aire se calcularon como índice de una correcta reversibilidad del proceso de óxido-reducción de la ferredoxina.

4.1.3.- Determinación del potencial redox biológico normal.

En una cubeta Thumberg se colocaron en el compartimiento central 1.5 ml. de solución 0.1 mM. de metilviológico en buffer Tris-ClH pH 7.7 disolviendo luego en la misma suficiente cantidad de ferredoxina liofilizada hasta obtener una absorción del orden de 0.95-1.00 a 422 nm. Efectuar una lectura exacta de este valor frente a un blanco de buffer.

Colocar ahora 13 μ l. de la solución de ditionito en el brazo lateral y seguir una pauta análoga a la indicada anteriormente; transcurridos los 10 min. de equilibramiento efectuar la lectura de absorción a 740 y 422 nm. frente al mismo blanco anterior. Llevar a cabo ahora adiciones sucesivas de 25 μ l. de aire, y efectuar después de alcanzado el equilibrio lecturas a 740 y 422 nm., dando por concluida la experiencia cuando a 740 nm. la lectura sea prácticamente nula, y a 422 nm. se obtengan lecturas análogas de la solución de partida.

En cada caso se extrapoló la lectura a 740 nm. debida al metilviológico al correspondiente valor a 422 nm., mediante el uso de la razón de absorciones A_{740}/A_{422} calculada ante-

mente. Este valor se dedujo de la lectura efectuada a 422 nm., y con este diferencia correspondiente a la absorción de ferredoxina en situación de equilibrio se computó el valor f:

$$f = \frac{A_{\text{ferred.oxd.}} - A_{\text{ferred.equil.}}}{A_{\text{ferred.oxd.}}}$$

Si llamamos M a la absorción a 740 nm. en estado de total reducción del metilviológeno, y M' a la misma absorción en situación de equilibrio, la cantidad de metilviológeno reducido en este momento vendrá dada por la expresión:

$$\% \text{ de metilviológeno reducido} = \frac{100 M'}{M}$$

Análogamente, el porcentaje de ferredoxina oxidada en la situación de equilibrio será:

$$\% \text{ de ferredoxina oxidada} = \frac{100 f}{F}$$

Por aplicación de la fórmula I antes indicada se determinó el potencial redox en cada situación de equilibrio, tomándose como definitivo el valor medio.

4.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.05M pH 7.7 .

Tris 0.1M (12.114 g./litro de Tris, calidad Merck p.a.) .

. 50 ml.

ClH 0.1N (8.4 ml./litro de ClH fumante = 1.19, calidad -

Merck p.a.) 36.6 ml.

Ajustar el pH y enrasar a 100 ml. con agua dest.

- Sol. 0.1 mM de metilviológeno.

2.57 mg./100 ml. de metilviológeno, calidad Sigma, en el buffer anterior.

- Sol. 100 mM de ditionito sódico.

17.4 mg./ml. de ditionito sódico, calidad Merck, en agua dest. recién hervida. Ha de usarse inmediatamente después de su preparación.

5.- Determinación del peso molecular.

Se llevó a cabo por tres procedimientos: Centrifugación en gradiente de densidad, por contenido molar en hierro, y atendiendo a la composición en aminoácidos. Estos dos últimos se describen más adelante, en los epígrafes dedicados al contenido en hierro y composición en aminoácidos de las ferredoxinas.

En cuanto al primero se efectúa de acuerdo con la técnica de Martín y Ames (163). La proteína a analizar se deposita sobre la superficie de un gradiente lineal de sacarosa creado entre los límites prefijados en el interior de un tubo de centrífuga, alcanzando después de un tiempo de centrifugación suficiente una posición de equilibrio definida por su peso molecular. Este se calcula por interpolación entre las posiciones alcanzadas por proteínas standard adecuadas, sometidas a centrifugación en condiciones análogas al problema.

Con este método se consiguen resultados comparables a los suministrados por la ultracentrifugación analítica cuando de proteínas de peso molecular inferior a 50000 se trata. Sin embargo, con proteínas de baja magnitud molecular las posiciones de equilibrio se tornan menos precisas debido a la alta tasa de difusión, obteniéndose esquemas de elución con picos poco agudos, en los que resulta a veces difícil determinar la zona de máxima concentración protéica. No obstante, el método sigue siendo válido, sobre todo cuando no se pretende de él una precisión extremada.

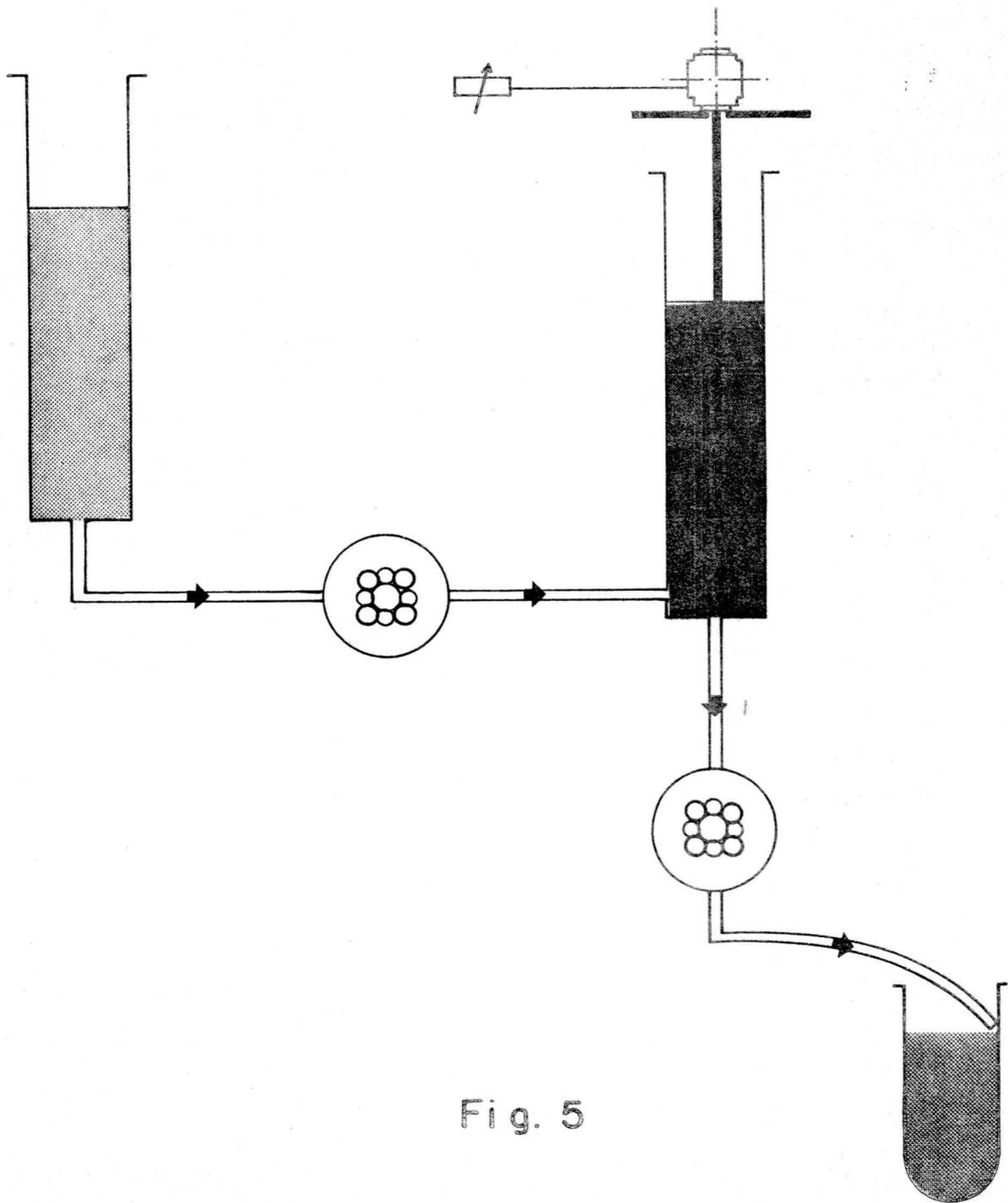


Fig. 5

5.1.- Metódica.

Comprende tres momentos bien diferenciados: formación del gradiente, centrifugación y elución.

5.1.1.- Formación del gradiente.

Se utilizaron tubos de centrífuga de 5 ml. de capacidad útil, capaces de albergar los 4.6 ml. de volumen total del gradiente. Este se estableció entre concentraciones de sacarosa de 2 y 10%, disuelta en buffer Tris-ClH 0.05M pH 7.3. Un gradiente lineal entre ambas concentraciones se consiguió - disponiendo en sendos recipientes cilíndricos de 1 cm. de diámetro interior, 2.3 ml. de ambas soluciones límite de sacarosa. El recipiente que contiene la solución densa presenta una tubuladura lateral, por la cual penetrando al flujo constante de 0.2 ml./min., suministrado por una bomba peristáltica, el contenido del recipiente que alberga la solución ligera.

Ambas soluciones se van mezclando continuamente mediante un pequeño agitador, constituido por un motor regulable a cuyo eje se adaptó un alambre de platino que penetra hasta el fondo del tubo de mezcla. El drenado de éste se inicia simultáneamente al momento de llegada de la solución ligera a la densa, efectuándose por la parte inferior del tubo de mezcla a una velocidad constante y flujo doble del de aporte de la solución ligera, lo que se consigue con una segunda bomba peristáltica perfectamente calibrada.

El conjunto del dispositivo descrito se representa en la figura 5. La idoneidad del gradiente así formado se corroboró en ensayos previos, en los que se adicionó hemoglobina a la solución densa; en tales condiciones se establece, paralelo al gradiente de sacarosa, un gradiente coloreado de hemoglo

bina, cuya linealidad se pudo comprobar por elución posterior según se indica más adelante, con registro colorimétrico a 430 nm. en célula de flujo continuo.

5.1.2.- Centrifugación.

Los tubos llenos, junto con el rotor de la centrífuga, se llevaron a estabilización térmica en cámara frigorífica a 4º C. durante un par de horas. Entonces se depositaron cuidadosamente las muestras sobre la superficie de los gradientes, usando para ello una microjeringa de las usadas en cromatografía gaseosa. Los volúmenes de muestra depositados - depositados fueron siempre de 0.1 ml., estando disueltos los problemas y standards en el mismo buffer Tris-ClH 0.05M pH 7.3 anterior.

Como standards se utilizaron citocromo C, de peso molecular 13300 y coeficiente de sedimentación $S_{20W}=1.83S$, mioglobina, de peso molecular 18500 y $S_{20W}=2.01S$, y quimotripsinógeno A, peso molecular 24200 y $S_{20W}=2.58S$, todos ellos calidad Serva Feinbiochemica, a una concentración del 0.1%.

Las muestras de ferredoxina de espinaca y lechuga - se prepararon disolviendo en dicho buffer los correspondientes liofilizados, también a una concentración aproximada del 0.1%, lo que corresponde a una absorción a 420 nm. del orden de 0.9.

Los tubos se montaron en el rotor Nº 2414, tipo swinging-bucket, de una ultracentrífuga MSE mod. Superspeed 40, sometándose a 4º C a una centrifugación a 39000 r.p.m. (x 130.000 g) durante 14 horas. Especial énfasis se puso en conseguir una aceleración al inicio, y una desaceleración al final, gradual, que evitase distorsiones del gradiente y material sedimentado.



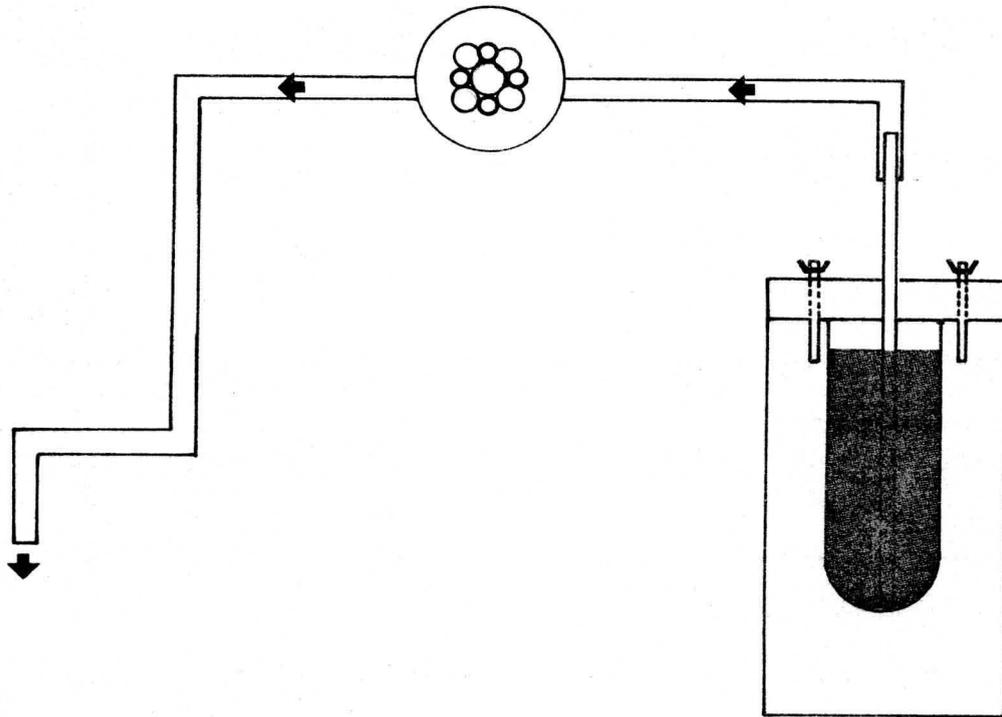


Fig. 8

5.1.3.- Elución.

Terminado el proceso se sacaron cuidadosamente los tubos del rotor, colocándose en el interior del dispositivo de elución, mantenido en posición rigurosamente vertical. De los distintos procedimientos de evacuación que este dispositivo permite se usó el de drenado a partir de la zona de mayor densidad, a través de un capilar de acero introducido verticalmente por la parte superior, del tubo de centrífuga, según se indica en la figura 8.

La idoneidad de este método en relación con el mantenimiento del gradiente se comprobó en una centrifugación adicional adicionando una pizca de negro de amido a la solución densa, y comprobación ulterior del mantenimiento de la linealidad por elución y registro continuo a 620 nm.

El flujo de drenaje fué de 0.4 ml./min. controlado por una bomba peristáltica, siendo monitorizado a 280 nm. en célula de flujo continuo de 3mm. de paso óptico (LKB, Uvicord II). Se recogió una fracción cada 20 segundos, lo que representa un total de 36 fracciones de aproximadamente 0.13 ml. cada una. Sobre ellas se realizaron pruebas complementarias de confirmación de la posición del pico de proteína.

En el registro continuo así obtenido se midieron las distancias desde el menisco -final de la elución- hasta el ápice del pico, calculándose el peso molecular y el coeficiente de sedimentación de las ferredoxinas, de acuerdo con la expresión:

$$R = \frac{\text{distancia viajada por el problema}}{\text{distancia viajada por el standard}}$$

$$R = \left(\frac{\text{Peso mol. problema}}{\text{Peso mol. standard}} \right)^{2/3} = \frac{S_{20} \text{ W del problema}}{S_{20} \text{ W del standard}}$$

5.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.05M pH 7.3 .

Tris 0.1M (0.6057 g./50 ml. de Tris, calidad Merck para)

..... 50 ml

ClH 0.1M (0.41 ml./50 ml. de ClH fumante d= 1.19, calidad Merck p.a.) 35 ml

Ajustar al pH-metro (Beckman-Expandomatic), y enrasar a 100 ml. con agua dest.

- Sol de sacarosa al 2%.

2 g./100 ml. de sacarosa, calidad Merck para centrifugación en gradientes, en el buffer anterior.

- Sol. de sacarosa al 10%.

10 g./100 ml. de sacarosa, calidad Merck para centrifugación en gradientes, en el buffer anterior.

6.- Composición en aminoácidos.

Las muestras de ferredoxinas de espinaca y lechuga se prepararon a partir de los liofilizados respectivos por disolución en agua dest. Se obtuvieron así soluciones de una absorción a 422nm. del orden 1.2 para la de espinaca, y de 0.5 para la de lechuga, lo que representa concentraciones aproximadas de 1.5 mg y 0.6 mg. de proteína/ml., respectivamente.

De cada uno de estos preparados se tomaron tres alícuotas análogas de 1 ml., dos de ellas para análisis de aminoá

cidos previa hidrólisis clorhídrica durante 20 y 70 horas, y la tercera para determinación de cisteína-cistina por oxidación - perfórmica.

6.1.- Hidrólisis ácida.

La hidrólisis se realizó en tubos de vidrio de paredes gruesas, de 5ml. de capacidad, estirados por un extremo en un cuello estrecho de 5 cm. de longitud.

A través de éste se pasó a cada tubo 1 ml. de las soluciones de ferredoxina, adicionando después un volumen igual - de ClH conc. del 37% $d = 1.19$, calidad Merck p.a.; de esta forma la solución final queda 6N en ClH. El contenido de los tubos se congeló a -60° C en mezcla acetona- nieve carbónica, practicándose entonces a través del cuello un vacío progresivo hasta 20 micrones. Finalmente, se cerró a la lámpara por la zona estrechada, llevándose a hidrólisis a 110° C durante 20 horas, uno, y - durante 70 horas, otro.

Pasado este tiempo los tubos se dejaron enfriar, se centrifugaron a 5000 r.p.m. ($2800 \times g$) para separar el material insoluble, y su contenido se pasó cuantitativamente por sucesivos lavados a sendos matraces de rotavapor, donde se procedió a eliminar el ClH a temperatura de 40° C y presión reducida (rotavapor Buchi). El residuo seco se disolvió en 10 ml. de agua destilada y se volvió a evaporar; repitiendo la operación una vez más prácticamente se consigue la eliminación de la totalidad del ácido. El último residuo se disolvió en 5 ml. de buffer cítrico-citrato 0.2N en Na^+ pH 2.2, de modo que la concentración final en aminoácidos sea equivalente a unos 0.3 mg./ml. de proteína - original, concentración óptima para la obtención de unos buenos registros cromatográficos con el equipo instrumental a utilizar.

Estas soluciones antes de inyectarlas en el analizador de aminoácidos se filtraron por papel de filtro para eliminar cualquier residuo soluble.

6.2.- Oxidación perfórmica.

La tercera alicuota de 1 ml. se sometió a oxidación perfórmica según la técnica de Moore (164), seguida de hidrólisis a 110° C durante 20 horas.

Previamente las soluciones de ferredoxina se desecaron por liofilización en pequeños tubos de hemolisis. Cada liofilizado se disolvió entonces en 0.1 ml. de ácido fórmico del 88% enfriando luego la solución a 0° C en baño de hielo. Se agregaron 2 ml. del reactivo oxidante de ácido perfórmico previamente enfriado a la temperatura anterior y, una vez tapados los tubos con "Parafilm", el ataque se prolongó durante 4 horas a 0° C, - al cabo de las cuales se destruyó el exceso de oxidante agregando 0.3 ml. de BrH del 47%, calidad Merck p.a., también en frío.

El contenido de cada tubo se pasó cuantitativamente a pequeños matraces de rotavapor, eliminándose a 40° C y a presión reducida el bromo formado y el BrH en exceso mediante evaporaciones y disoluciones sucesivas en agua dest. Resulta conveniente interponer entre la bomba de vacío y el rotavapor trampas de NaOH y nieve carbónica para atrapar el material evaporado. - El residuo seco se disolvió en 1 ml. de ClH 6N, pasándolo cuantitativamente mediante lavados con 2 ml. adicionales del reactivo clorhídrico a sendos tubos de hidrólisis donde, previa congelación y vacío según se indicó anteriormente, se efectuó la hidrólisis de la proteína oxidada a 110° C durante 20 horas.

Finalmente, se evaporó el ClH y disolvió el residuo seco en 5 ml. del buffer cítrico-citrato anterior.

6.3.- Análisis cromatográfico de aminoácidos.

Se ha efectuado según la técnica de Moore, Spackman y Stein (165) en un autoanalizador de aminoácidos JEOL, mod. - JLC-6 AH, provisto de sistema de doble columna termostatables a la temperatura deseada: una corta para aminoácidos básicos, es estabilizada y eluida con buffer cítrico-citrato sódico 0.35N en Na^+ pH 5.30, y una larga para aminoácidos ácidos y neutros, estabilizada y eluida con buffer cítrico-citrato sódico 0.2N en Na^+ pH 3.28 primero, y buffer cítrico-citrato sódico 0.2N en Na^+ pH 4.30, después.

El aparato está equipado de inyección automática de muestras, pudiéndose programar todo el proceso hasta un total de 6 muestras mediante un sistema de cinta perforada de 10 canales, que controlan la puesta en marcha y parada de las bombas de impulsión y detección, cambio de buffer y de la solución de regeneración, inyección de nuevas muestras, selector de columna hacia la zona de detección, selector de toma del reservatorio de ninhidrina o de la solución de lavado del circuito de la misma, parada final del equipo de registro, etc. Cada análisis tiene una duración de 5 horas y media, con lo que la autonomía total del equipo es de 33 horas a plena carga.

El desarrollo del proceso cromatográfico queda registrado en un registrador de tres canales, por inscripción discontinua cada 2 segundos de las lecturas a 440 nm. (canal 1 en sensibilidad x 3) y 570 nm. (canales 2 y 3 en sensibilidades x 3 y x 1), que un doble detector efectúa en sendas células de flujo continuo sobre los compuestos coloreados producidos, al reaccionar los aminoácidos con el reactivo ninhidrínico.

Las lecturas a 440 nm. se utilizan sólo para cuantificación de la prolina -e hidroxiprolina si la hubiese-, mientras que las obtenidas a 570 nm., para los restantes aminoácidos; ello

deriva de la coloración amarilla que la ninhidrina produce con los primeros, con un máximo de absorción a 440 nm. frente al máximo a 570 nm. de la coloración purpúrea producida con los segundos.

Las lecturas de absorción correspondientes a cada pico son acumuladas y, finalmente, totalizadas por un integrador de doble canal, provisto además de discriminadores de modificación de línea de base y de picos espúreos debidos a ruidos electrónicos. Los datos finales son impresos a ambas longitudes de onda en un impresor de datos, que suministra además el tiempo de retención del aminoácido en cuestión.

La determinación cuantitativa de cada aminoácido se efectúa por comparación de la absorción totalizada de su pico, con la correspondiente al mismo aminoácido de una solución standard de concentración conocida, y cromatografiada de manera paralela.

En resumen, las características del proceso cromatográfico fueron:

Columna corta (básicos)

Columna larga (ácidos y neutros)

Resina: Sulfónica JEOL LC - R - 1

Dimensiones: 0.8 x 15 cm.

Dimensiones 0.8 x 50 cm.

Buffer de elución:

Buffers de elución:

cítrico-citrato 0.35N en Na⁺

1º cítrico-citrato 0.2N en Na⁺

pH = 5.30 (2 horas)

pH = 3.28 (1 hora 45 min.)

2º cítrico-citrato 0.2N en Na⁺

pH = 4.30 (1 hora 45 min)

Regeneración: NaOH 0.2N

Flujo de columna: 1.15 ml/min.

Temperatura de las columnas: 52° C.
 Flujo del detector: 0.42 ml/min.
 Flujo de ninhidrina: 0.21 ml/min.
 Temperatura del baño de ninhidrina: 95° C
 Tiempo de reacción: 7 min.
 Camino óptico de las células del detector : 2 mm.
 Sensibilidad del detector:
 a 570 nm.: x 1 (0-100% T)
 x 3 (70-100% T)
 a 440 nm.: x 3 (70-100% T)
 Velocidad de carta del registrador: 12 cm/hora.

El volumen de muestra necesario es, aproximadamente, de 1 ml. por columna, dependiendo de la posición del muestreador en que se inyecte. Cada una de estas posiciones posee un factor de corrección en relación con la posición nº 1, que standardiza el volumen de muestra analizado. Puesto que la solución standard contiene 0.1 μ M/ml. de cada aminoácido, la cantidad de cada uno de ellos en la solución de ferredoxina vendrá dada por la expresión:

$$\mu\text{M de aminoácido/ml} = \frac{A_p \times f \times 0.5}{A_s \times f'}$$

A_p = absorción totalizada del pico de aminoácido en la sol. problema.

A_s = absorción totalizada del pico de aminoácido en la sol. standard.

f = factor de corrección de la posición muestreadora del problema.

f' = factor de corrección de la posición muestreadora del standard.

Puesto que la hidrólisis ácida a 110° C durante 20 horas en las condiciones indicadas produce una destrucción parcial de los aminoácidos treonina, tirosina y serina, estimada alrededor del 5% para los primeros y en un 10% para el tercero, quedando inalterados los restantes, la cuantificación de éstos se hizo sobre los hidrolizados de 20 horas, mientras que con los tres aminoácidos indicados se efectuó el cálculo independiente para los hidrolizados de 20 y 70 horas, haciéndose luego la extrapolación a tiempo cero de hidrólisis según la expresión:

$$\log A_0 = \left(\frac{t_2}{t_2 - t_1} \right) \log A_1 - \left(\frac{t_1}{t_2 - t_1} \right) \log A_2$$

A_0 = concentración de aminoácido a tiempo 0 de hidrólisis.
 A_1 = " " " " " 20 horas de hidrólisis.
 A_2 = " " " " " 70 " " "
 t_2 = máximo tiempo de hidrólisis (70 horas).
 t_1 = mínimo " " " (20 horas).

6.4.- Análisis cromatográfico de ácido cistéico.

Se llevó a cabo en el mismo autoanализador anterior, y por tratarse de un aminoácido ácido su individualización se efectuó en la columna larga. Su tiempo de retención es muy corto, puesto que su alta acidez impide su fijación por la resina en las condiciones de estabilización de ésta a pH 3.28. Así pues, el programa se reduce a inyectar la muestra en la columna larga, y esperar su elución una vez hecha la progresión a su través. La única precaución a tomar estaba en tener la certeza de que el material hidrolizado no contiene ningún otro componente ácido que, ni sea fijado por la resina ni absorba a 570 nm., longitud de onda a la que se verifica la cuantificación -

del ácido cistéico.

Como standard se utiliza una sol. de ácido cistéico que contiene $0.1 \mu\text{M}/\text{ml}$. Por lo demás, las condiciones de cálculo son análogas a las anteriormente indicadas, dándose el resultado final en μM de $1/2$ cistina, expresión que indica la suma de los valores de cisteína y cistina presentes en la molécula.

6.5.- Cálculo del peso molecular atendiendo a la composición en aminoácidos.

La determinación del peso molecular se hace muchas veces atendiendo al criterio del peso molecular mínimo. Puesto que una proteína ha de tener moléculas completas de aminoácidos, podemos considerar que el aminoácido en mínimo se encuentra en un contenido de 1 resto por molécula; dividiendo las concentraciones de los restantes aminoácidos por la correspondiente al aminoácido en mínimo -para las ferredoxinas de espinaca y lechuga analizadas sería la metionina-, se obtendrán las razones molares de cada uno de ellos en relación a la metionina. Estos valores representan, una vez ajustados a unidades, el número mínimo de restos de cada aminoácido que compone la molécula protéica. El factor de multiplicación de esta composición mínima vendrá sugerido por los datos suministrados por técnicas paralelas de determinación del peso molecular.

Este método tiene el gran inconveniente de usar como base de cuantificación el contenido del aminoácido minoritario, cuya determinación, precisamente por eso, está frecuentemente sometida a un fuerte error, que es arrastrado a todos los demás. Por todo ello, muchos autores toman como base de cuantificación el contenido en un aminoácido de concentración media en la pro

teína a estudiar, y que aparezca perfectamente individualizado en el proceso de elución cromatográfica del autoanализador, razones todas que permitirán una dosificación lo más exacta posible. En relación con las ferredoxinas estudiadas este requisito lo cubre la leucina.

Fijando distintos contenidos molares de leucina por molécula de proteína obtendremos, siguiendo la pauta antes indicada, los correspondientes a los demás aminoácidos y, a partir de ellos, los pesos moleculares correspondientes a la proteína de partida. De estos valores habrá que deducir las $n-1$ moléculas de agua de los enlaces peptídicos establecidos entre las n moléculas de aminoácidos y, finalmente, agregar el contenido en hierro y azufre-lábil obtenidos de determinaciones independientes de hierro y S^{2-} .

De los distintos pesos moleculares obtenidos se considerará más probable aquél más coincidente con el obtenido por otra u otras técnicas paralelas, en este caso el dato suministrado por la ultracentrifugación en gradiente o el deducido a partir del contenido en hierro.

6.6.- Reactivos.

- Buffer cítrico-citrato 0.2N en Na^+ pH 2.2
Disolver 9.85 g. de citrato sódico $2H_2O$, calidad Merck p.a., en unos 480 ml. de agua bidest. Ajustar al pH indicado con ClH conc. $d=1.19$, calidad Merck p.a., completando después a 500 ml. con más agua bidest.

- Acido fórmico al 88%.

Diluir 9 partes de ácido fórmico del 98-100%, calidad Merck p.a., con 1 parte de agua dest. (v:v).

- Reactivo de ácido perfoímico.

Peróxico de hidrógeno del 30%, Perhidrol calidad Merck p.a. 1 ml.
Acido foímico del 88% 9 ml.

Se deja estar a la temperatura ambiente durante 1 hora, enfriándolo después a 0° C en baño de hielo. Usarlo inmediatamente.

- Acido clorhídrico 6N.

Diluir v/v ClH fumante d=1.19, calidad Merck p.a., con agua dest.

- Buffer cítrico-citrato 0.2N en Na⁺ pH 3.28.

Disolver los siguientes componentes:

Citrato sódico.2H₂O, calidad Merck p.a. 98.5 g.
ClH fumante d=1.19, calidad Merck p.a. 58.2 ml.
Acido n-caprílico, calidad Merck p.a. 0.5 ml.
Tiodiglicol, calidad Merck p.a. 25 ml.
n-propanol, calidad Merck p.a. 350 ml.

en agua bidest. hasta un volumen de 5 litros. Ajustar el pH con ClH conc. o sol. concentrada de NaOH, según el caso.

- Buffer cítrico-citrato 0.2N en Na⁺ pH 4.30.

Disolver los siguientes componentes:

Citrato sódico.2H₂O 98.5 g.
ClH fumante d=1.19 39.7 ml.
Acido n-caprílico 0.5 ml.
Tiodiglicol 25 ml.

en agua bidest. hasta un volumen de 5 litros, y ajustar según

se indicó anteriormente.

- Buffer cítrico-citrato 0.35N en Na⁺ pH 5.30.

Disolver los siguientes componentes:

Citrato sódico.2H ₂ O	171.5 g.
ClH fumante d= 1.19	30.7 ml
Acido n-caprílico	0.5 ml

en agua bidest. hasta un volumen de 5 litros. Ajustar al pH-metro según las normas anteriores. Para la preparación de este reactivo conviene extremar las precauciones respecto a la ausencia de amoníaco en el agua y reactivos usados, así como de vapores del mismo en el ambiente donde se prepare.

- Buffer acético-acetato 4N en Na⁺ pH 5.5.

Disolver a unos 60° C, y con agitación constante, los siguientes componentes:

Acetato sódico.3H ₂ O, calidad Merck p.a.	544.05 g.
Acido acético glacial, calidad Merck o.a.	100 ml.

en 500 ml. de agua bidest. Dejar enfriar y llevar a 1 litro con más agua, ajustando al pH indicado con ácido acético glacial o sol. concentrada de NaOH, según el caso. Poner el mismo énfasis anteriormente indicado en la ausencia de trazas de amoníaco.

- Sol. tamponada de ninhidrina.

Se prepara en el mismo recipiente, herméticamente cerrado, que trae el aparato para el almacenaje de este reactivo. Dada su gran inestabilidad al aire, a las temperaturas aún moderadas y, sobre todo, frente a las trazas de amoníaco, su elaboración ha de ser muy cuidadosa. El problema del aire se evita preparándolo en ambiente de nitrógeno, el de la tempera-

tura haciéndolo a 4^o C en el frigorífico que lleva anejo el aparato, y la presencia de amoníaco usando reactivos totalmente exentos de él.

Una vez desalojado el aire del recipiente mencionado mediante un flujo continuo de nitrógeno -se usa el tipo NN-52, del 99.999% de pureza- se disponen en él los siguientes reactivos:

Buffer acético-acetato 4N en Na⁺ pH 5.5. 500 ml.
Metilcelosolve, calidad BDH. 1500 ml.

Se hace ~~barboteaz~~ barboteo de nitrógeno a su través durante 10 min. agregándose entonces 40 g. de ninhidrina, calidad Merck p.a. El mismo barboteo del nitrógeno ayuda a su disolución y, cuando ésta es completa, se adicionan 1.2 g. de Cl₂Sn.2H₂O, calidad Merck p.a. Se ~~mantiene~~ mantiene el barboteo durante 15 min. adicionales, dejándose entonces estar el reactivo bajo una presión de nitrógeno de 0.5 Kg/cm².

El reactivo recién preparado es de color rojo oscuro, pero ya a las 24 horas ha tomado una coloración rojo-rubí pálido, estando en disposición de usarse. Una preparación deficiente se manifiesta por una coloración más o menos azul purpúrea.

- Sol. de regeneración de las columnas de resina.

Sol. 0.2N de NaOH (8 g/l de NaOH, calidad Merck p.a.)

- Sol. de lavado de los circuitos de ninhidrina.

Agua dest.: metilcelosolve (v/v).

- Sol. standard de aminoácidos.

Se preparó diluyendo al 1/25 con buffer cítrico-citrato 0.2N en Na⁺ pH 2.2, la solución madre de aminoácidos de la ca-

sa Halmiton. Esta contiene $2.500 \pm 0.004 \mu\text{M/ml}$. de aminoácidos: lisina, histidina, arginina, á. aspártico, treonina, serina, á. glutámico, prolina, glicocola, alanina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina y fenilalanina, más una concentración análoga de NH_4^+ en forma de clorhidrato, y una concentración mitad de cistina. Así pues, la solución diluida contendrá 0.1 M/ml . de cada uno de ellos, y $0.05 \mu\text{M/ml}$. de cistina.

- Sol. standard de ácido cisteico.

Se prepara previamente una solución madre conteniendo $2.5 \mu\text{M/ml}$. de ácido cisteico (46.8 mg./100 ml. de ácido cisteico monohidrato, calidad Sigma, en buffer cítrico-citrato - 0.2N en Na^+ pH 2.2). Esta solución se diluyó al $1/25$ con el mismo buffer, quedando entonces a la concentración de $0.1 \mu\text{M/ml}$.

7.- Contenido en hierro.

Para la determinación del hierro presente en la molécula de ferredoxina se empleó la técnica analítica de absorción atómica (166).

El método se basa en la propiedad que tienen los átomos neutros de un elemento de absorber su propia radiación de resonancia. La cuantía de esta absorción es proporcional al número de átomos sobre los que incide dicha radiación.

En un espectrofotómetro de absorción atómica, la radiación de resonancia del elemento en cuestión -de λ y ν características y específicas- producida por la fuente de emisión (I_0), se hace pasar a través de una nube de vapor atómico de dicho elemento, producida en un quemador por vaporización y atomización a alta temperatura de la solución que lo contiene. La radiación de resonancia no absorbida (I) es seleccionada por un monocromador, y cuantificada mediante un receptor fotoeléctrico

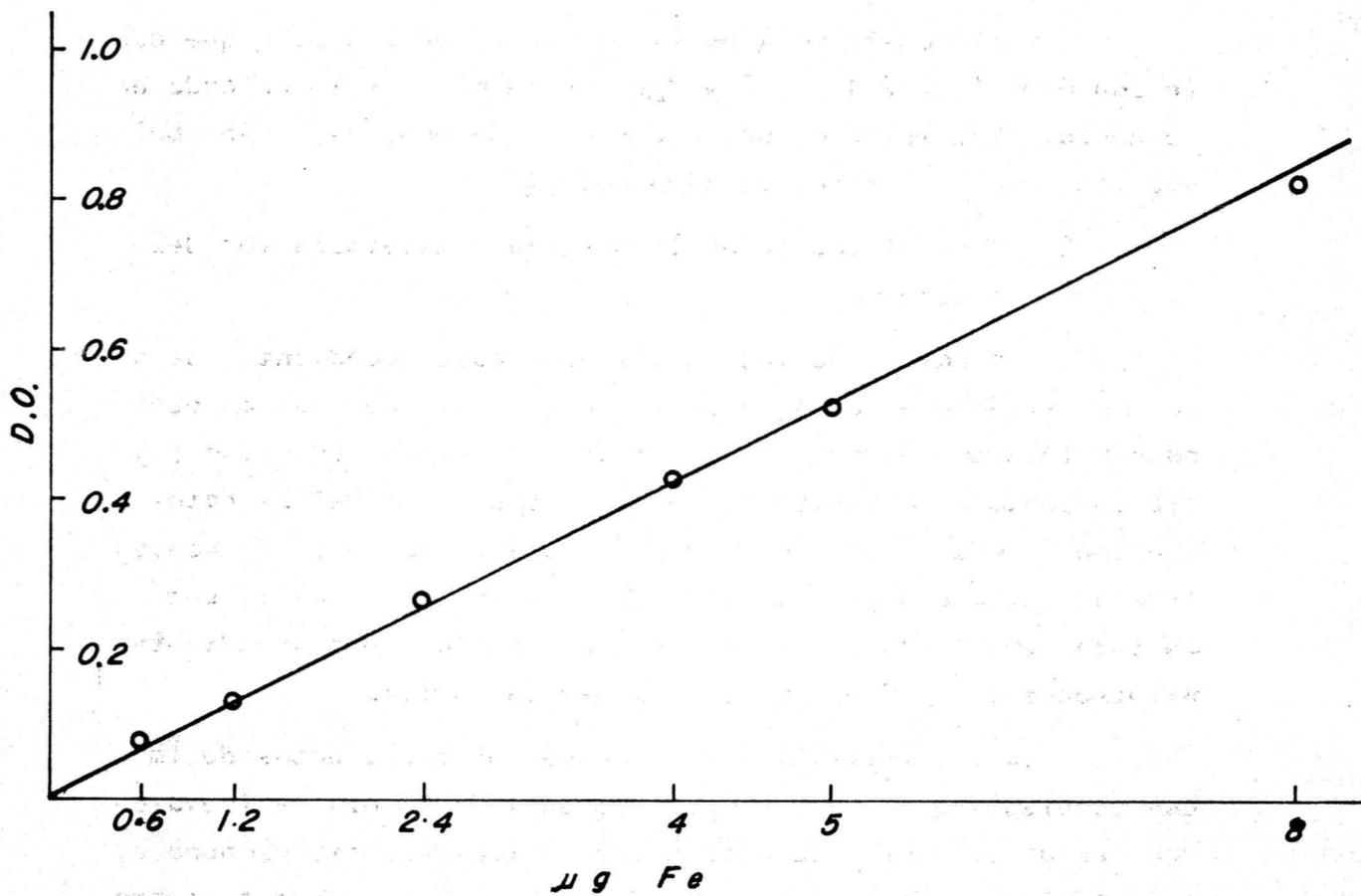


Fig. 9

que la transforma en impulsos eléctricos medibles. En estas condiciones I/I_0 es función de la concentración del elemento en la solución analizada. En la práctica esta concentración se determina sobre una curva patrón obtenida a partir de soluciones standard del mismo.

Se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer, mod. 290 B.

7.1.- Curva patrón de hierro.

Se construyó a partir de soluciones patrón que contenían 0.6, 1.2, 2.4, 4, 5 y 8 μg . de Fe/ml., representando en ordenadas las lecturas obtenidas en absorbancias, y en abscisas las concentraciones correspondientes.

7.2.- Mineralización de la muestra y determinación del hierro.

A partir de los liofilizados correspondientes se prepararon soluciones en agua dest. de las ferredoxinas de espinaca y lechuga. Dada la sensibilidad de la técnica a usar, y los contenidos en hierro presumibles deducidos de los datos bibliográficos, las soluciones se prepararon a una concentración entre 2.5 y 5 mg./ml., determinada exactamente por lectura espectrofotométrica a 422 nm. de las correspondientes diluciones al 1/10 de las soluciones de partida.

La mineralización se efectuó sobre alicuotas de 1ml. que se dispusieron en matraces Kjeldhal de 50 ml., y llevaron después hasta justa sequedad por evaporación sobre plancha calefactora. Una vez secos, los residuos se sometieron a un proceso de mineralización por vía húmeda nítrico-perclórica, con objeto de destruir la matriz proteica y llevar el Fe presente a forma inorgánica. A cada uno de los matraces se agregaron 2

2 ml. de mezcla oxidante nítrico-perclórica, realizándose el - ataque en caliente durante 10 min. sobre una batería de minera- lización termorregulada.

Una vez frío, se arrastró el contenido con agua dest. a sendos matraces aforados de 10 ml., enrasándose después. So- bre estas soluciones finales se realizaron las determinaciones calculando el contenido en hierro por interpolación en la cur- va patrón citada anteriormente.

La cantidad de hierro existente en la ferredoxina ven- drá dada por la expresión:

$$\text{contenido \% de hierro} = \frac{c}{C}$$

C = concentración en mg/ml. de ferredoxina en la solución ini- cial.

c = concentración en $\mu\text{g/ml}$. de hierro leída en la curva de re- ferencia.

7.3.- Cálculo del peso molecular por contenido molar en - hierro.

Obtenido el tanto por ciento en peso de hierro se - calculan fácilmente los pesos moleculares teóricos que corres- pondeían a la ferredoxina sobre la base de distinto número de átomos de hierro por molécula. El peso molecular **correcto** ven- drá señalado por el obtenido mediante una técnica **paralela**, en nuestro caso la centrifugación en gradiente.

7.4.- Reactivos.

- Sol. base de hierro.

Se preparó disolviendo 1 g. de hierro reducido, cali- dad Merck p.a., en 50 ml. de ácido nítrico al 50%, calentando hasta total disolución; una vez enfriado se llevó a 1 litro - con agua bidest. Esta solución contiene 1 mg./ml. de hierro.

- Sol madre de hierro.

Dilución al 1/5 con agua bidest. de la solución anterior. Esta solución contiene 0.2 mg./ml. de hierro.

- Soluciones patrón de hierro.

De la solución madre se tomaron 0.15, 0.30, 0.60, 1, 1.25 y 2 ml., y se llevaron a 50 ml. con agua bidest., añadiendo antes de enrasar 1.5 ml. de ácido perclórico del 70% d=1.67, calidad Merck p.a., para obtener la misma acidez perclórica del problema.

- Mezcla oxidante nítrico-perclórica al 15%.

Mezclar 85 ml. de ácido nítrico fumante d= 1.52, calidad Merck p.a., con 15 ml. de ácido perclórico del 70% d= 1.67, calidad Merck p.a.

8.- Determinación de azufre inorgánico como S^{2-} .

Se determinó según la técnica de Lovenberg y col.(91), adaptación del método de Fogo y Popowsky (167).

El SH_2 es precipitado en forma de sulfuro de cinc; - éste, una vez redisolto en medio alcalino, reacciona con p-di metilamino anilina en presencia de cloruro férrico, formándose un azul de metileno con máximo de absorción a 670 nm. La cantidad de sulfuro presente en la muestra se calculó por interpolación en una curva patrón de sulfuro.

Puesto que existe el peligro de una pérdida de SH_2 - por difusión, hay que efectuar la reacción en tubos de poca capacidad, bien cerrados, que se mantendrán destapados el menor tiempo posible.

8.1.- Curva patrón de sulfuro.

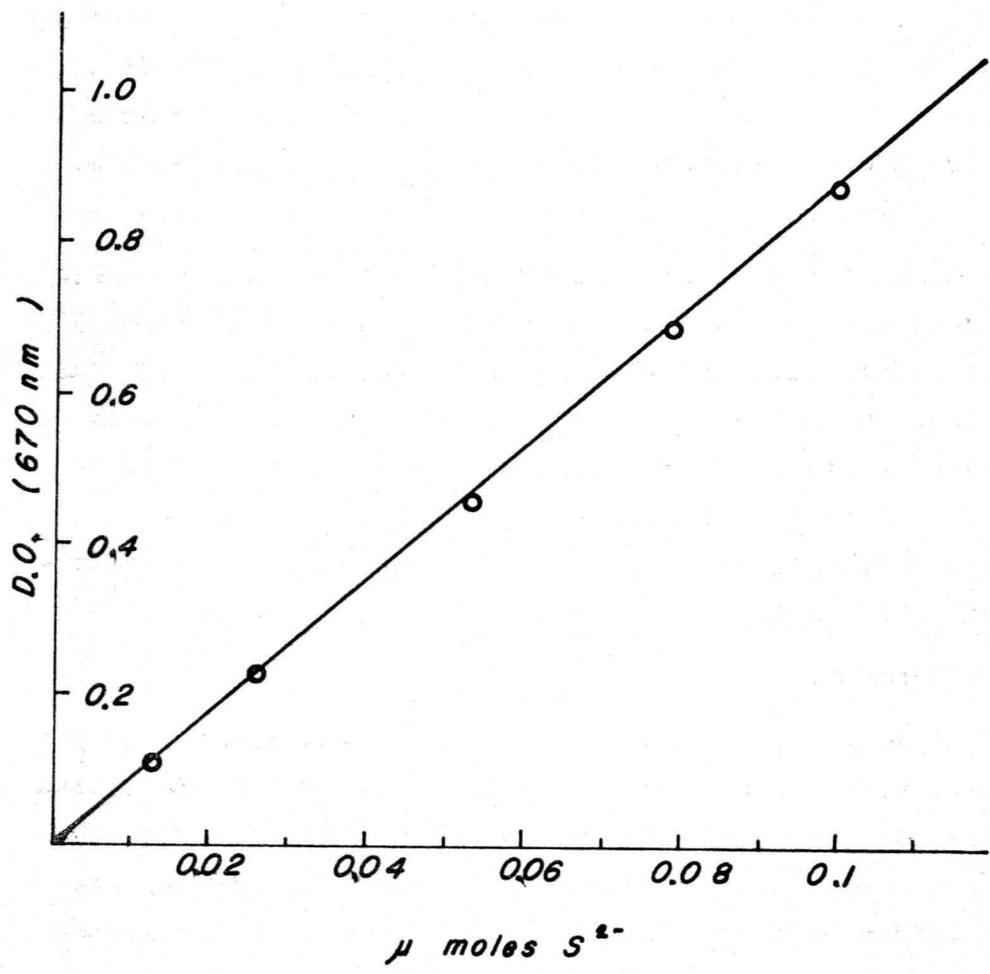


Fig. 10

Se construyó con 5 concentraciones comprendidas entre 0.01 y 0.1 μM . La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente en tubos de 5 ml. provistos de cierre esmerilado, en cada uno de los cuales se dispusieron por el siguiente orden, con rapidez y tapando inmediatamente los tubos después, los reactivos indicados:

- Sol. de acetato de cinc 1.3 ml.
- Sol. standard de sulfuro sódico 0.85 ml.
- Sol. de NaOH al 12% 0.05 ml.
- Sol. de p-dimetilaminoanilina 0.25 ml.
- Sol. de cloruro férrico 0.05 ml.

Como blanco se utilizó un tubo análogo que contenía 0.85 ml. de agua dest. en lugar de solución standard. A los 20 min. de la última adición se determinó la absorción a 670 nm. (Perkin-Elmer, mod. 124), valores que se llevaron al eje de ordenadas de un sistema coordinado, en el que se representaron en abscisas las correspondientes concentraciones de sulfuro: 12.75, 25.5, 51.0, 76.5 y 102.0 ($\times 10^{-3} \times f$) μM , siendo f el factor calculado para la concentración base de sulfuro.

8.2.- Metodica.

A partir de los liofilizados correspondientes se prepararon soluciones en agua dest. de las ferredoxinas de espinaca y lechuga a concentraciones entre 0.4-0.5 mg./ml., correspondientes a absorciones a 422 nm. del orden de 0.3-0.4, las cuales se determinaron exactamente en función del coeficiente de absorción de cada una de ellas.

La determinación se efectuó sobre alícuotas de 0.85 ml., siguiendo una metodología en todo análoga a la descrita para la construcción de la curva standard. Antes de efectuar la lec

tura espectrofotométrica resulta necesario centrifugar a 5000 r.p.m. (2800 x g) durante 10 min., a fin de separar el precipitado debido a la matriz protéica de la ferredoxina. Los resultados de absorción obtenidos se llevaron a ésta, calculándose por interpolación las correspondientes concentraciones de sulfuro.

8.3.- Reactivos.

- Sol. base 0.1N de sulfuro sódico.

12.01 g./litro de $\text{SNa}_2 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, calidad Merck p.a., en agua dest. previamente desgasada por ebullición.

Este reactivo fué titulado yodométricamente para la dosificación exacta de la concentración de sulfuro, determinándose su factor f.

- Sol. madre de sulfuro sódico.

Se obtuvo por dilución de la anterior al 1/50.

- Soluciones patrón de sulfuro.

A partir de la sol. madre se prepararon las 5 soluciones a usar en la curva standard tomando 1.5, 3, 6, 9 y 12 ml. y llevando a 100 ml. con agua dest. Esto corresponde a concentraciones respectivas de 0.015, 0.03, 0.06, 0.09 y 0.12 $\mu\text{M}/\text{ml}$., que han de venir multiplicadas por el factor calculado para la solución madre.

- Sol. de acetato de cinc al 1%.

1 gr./100 ml. de acetato de cinc, calidad Merck p.a.

- Sol. de NaOH al 12%.

- Sol. al 0.5% de p-dimetilamino anilina - en ClH 5.5 N.

0.25 g./50 ml. de N,N-dimetil-p-fenilendiamina clorhidrato, calidad Sigma, en clorhídrico al 46% (v:v).

- Sol. 0.023 M de cloruro férrico en ClH
1.2M.

0.1554 gr./25 ml. de $\text{Cl}_3\text{Fe} \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, calidad Merck p.a.
en clorhídrico al 10% (v:v).

9.- Determinación de grupos-SH titulables.

El contenido en grupos -SH libres de ambas ferredoxinas se determinó por titulación con p-hidroximercuribenzoato (PHMB), según Boyer (168).

El método determina la tasa de reacción entre proteí
na y reactivo siguiendo espectrofotométricamente la formación
del mercáptido por su absorción al ultravioleta a 250 nm.

La titulación se efectuó manteniendo constante la -
concentración de ferredoxina, e incrementando paso a paso la
cantidad de PHMB. En estas concidiciones la absorción a 250 nm
se incrementa progresivamente hasta alcanzar un punto máximo -
en el que todos los grupos -SH accesibles han sido bloqueados
por PHMB.

9.1.- Metodica.

Se titularon sendas soluciones de ferredoxinas de -
espinaca y lechuga, que se obtuvieron por disolución de los liq
filizados respectivos en buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3, hasta -
una absorción a 422 nm. del orden de 0.3-0.4 -valor que corres
ponde a una concentración de aproximadamente 0.4 mg/ml- y de -
la cual se dedujo exactamente su concentración a partir de los
datos del coeficiente de absorción.

Cada determinación se realizó sobre 2 ml. de las so-
luciones así preparadas, en cubetas espectrofotométricas de -
cuarzo de 10 mm. de paso óptico, termostatzadas a 20° C, so--

bre las cuales se hicieron adiciones sucesivas de alícuotas de 50 l. de sol. 1 mM de PHMB en el mismo buffer de disolución de la muestra.

Después de cada adición se esperó 25 min. para que la reacción fuese a término, efectuándose entonces la lectura espectrofotométrica a 250 nm. (Perkin-Elmer, mod. 124) frente a un blanco de 2 ml. de agua dest., al que paralelamente se adicionaban las mismas alícuotas de PHMB que al problema.

La cinética de la reacción es lineal, con una absorción creciente mientras queden grupos -SH sin reaccionar, anulándose la pendiente a partir del momento de equivalencia. El número de restos -SH titulables existentes por molécula de ferredoxina vendrá dado por la expresión:

$$N = \frac{n}{A \times 40}$$

A = concentración mM del preparado de ferredoxina.

n = número de alícuotas (50 l.) de PHMB adicionadas.

9.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.15M pH 7.3 .

Tris 0.3M (36.342 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.) 500 ml.

ClH aprox. 0.3M (24.9 ml. de ClH fumante d = 1.19, calidad

Merck p.a.) 370 ml.

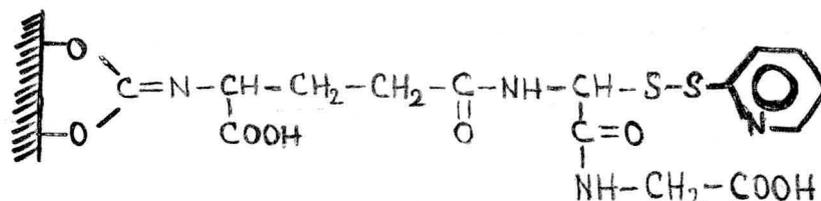
Ajustar el pH con la sol. clorhídrica, y llevar a 1 litro con agua dest.

- Sol. 1 mM de p-hidroximercuribenzoato.

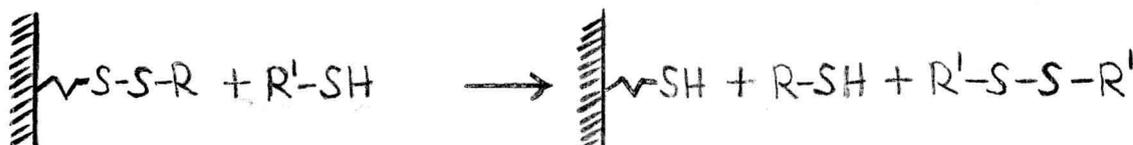
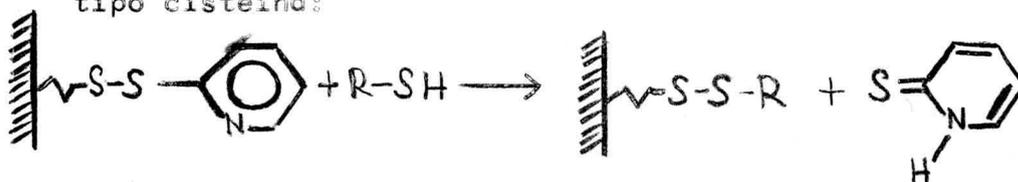
36.05 mg./100 ml. de p-hidroximercuribenzoato sódico, calidad Sigma, en el buffer anterior.

10. Determinación de accesibilidad de los grupos -SH por cromatografía de covalencia.

La tiol-Sepharosa 4 B activada es un derivado obtenido a partir de la CNBr⁻ Sepharosa por acoplamiento de glutatión, y reacción final con 2'-dipiridilo-disulfuro:



Este compuesto reacciona en condiciones suaves con solutos que contienen grupos -SH, con la formación de un derivado -S-S- del mismo covalentemente ligado, y liberándose 2-tiopiridona (169). El compuesto fijado puede ser posteriormente liberado de la matriz inerte por adición de un exceso de un reactivo -SH, tipo cisteína:



Así pues, el control del proceso de fijación podrá ser ejercido tanto por la desaparición de la solución inicial del compuesto a separar, como por la aparición en el material no fijado de la 2-tiopiridona, fácilmente detectable por su absorción a 343 nm.

En este proceso la cadena de glutatión sólo juega el papel de elemento separador del grupo activo piridínico de la matriz insoluble de Sepharosa, permitiendo así la accesibilidad de aquél a los grupos -SH de los solutos presentes. En consecuencia, este proceso permite separar compuestos que contienen restos -SH de los que no los posean, y en tal sentido - -

ha sido ya utilizado para la purificación de proteínas ricas - en grupos -SH (169) (170) (171); pero, además, permite analizar el grado de accesibilidad de los restos -SH de proteínas, accesibilidad que vendrá condicionada por la posición más o menos superficial de éstos dentro de la estructura tridimensional de la proteína, y por el volumen molecular del grupo activo piridínico.

10.1.- Metódica.

10.1.1.- Preparación de la columna.

En cada proceso cromatográfico se emplearon lotes de 0.5 gr. de tiol-Sepharosa 4 B, suministrada por Pharmacia (Uppsala), capaz de dar una vez hinchada un volumen de - lecho de 2ml. Previamente fué sometida a un proceso de lavado -para eliminar el anticontaminante con que se suministra-, hinchado y equilibrado con un volumen aproximadamente 200 veces - mayor (p:v) de buffer Tris-ClH 0.1M pH 7.3, 0.3M en ClNa, dividido en cuatro lotes iguales; esta operación se agiliza cuando se efectúa en un tubo de centrifuga, escurriendo el material y decantando el sobrenadante después de cada lavado por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 10 min.

En otras experiencias estas operaciones se efectuaron con la misma solución hecha 8M en urea. En cualquier caso, es conveniente someter las soluciones de equilibrado y elución posterior a un desgasado previo, a fin de evitar una posible oxidación de los grupos tiólicos libres.

Se emplearon columnas de 0.9 cm. de diámetro interior (Pharmacia, tipo K 9/15), en las que se empaquetaron a 4º C y al flujo de 4 ml./hora suministrado por una bomba peristáltica las alícuotas arriba indicadas de tiol-Sepharosa 4 B.

10.1.2.- Preparación de las muestras.

Los liofilizados de ferredoxina se disolvieron en las mismas soluciones de equilibrado anteriores, hasta una concentración aproximadamente 0.1mM, correspondiente a absorciones a 422 nm. del orden de 0.9 .

Las muestras disueltas en el buffer adicionado de urea se sometieron luego a incubación a 4° C en una célula espectrofotométrica, efectuándose un espectro cada 30 min. en la región del visible con vistas a seguir el proceso de desnaturación; éste se dió habitualmente por terminado al cabo de dos horas.

La comprobación de la irreversibilidad o no de la desnaturación por urea se efectuó dializando las muestras incubadas en membrana de celofán, frente al buffer pH 7.3 adicionado de ClNa, durante una noche en flujo continuo de la solución dializadora. Un espectro en la región del visible completaba el test de irreversibilidad.

10.1.3.- Cromatografía.

Volúmenes de 1.5 ml. de las muestras así preparadas se hicieron pasar a través de las correspondientes columnas a un flujo de 4 ml/hora y, una vez embebidas completamente en el lecho del gel, se dejaron estar durante una hora a fin de conseguir una fijación más completa. Transcurrido este tiempo se sometieron las columnas a un lavado con 6 ml. de la solución buffer adicionada de ClNa, pero en cualquier caso sin urea. Finalmente, se procedió a la elución del material fijado con la misma solución hecha 10 mM en cisteína. Ambas operaciones de lavado y elución se efectuaron al mismo flujo anterior, recogiendo fracciones de 1.5 ml. Estas se analizaron a 275 nm. para proteína, a 422 nm. para ferredoxina, y a 343 nm. para -

2-tiopiridona.

10.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.1M pH 7.3, 0.3M en -
ClNa.

Tris 0.2M (12.114 g./500 ml. de Tris, calidad Merck p.a.)
..... 500 ml

ClH 0.2M (8.3 ml./500 ml. de ClH fumante $d=1.19$, calidad
Merck p.a.) 370 ml

Ajustar el pH y llevar a 1 litro con agua dest. Lle-
var esta solución a una concentración 11.688 g./litro de ClNa,
calidad Merck p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.1M pH 7.3, 0.3M en -
ClNa y 8M en urea.

48.048 g./100 ml. de urea, calidad Merck p.a., en -
la solución anterior.

- Buffer Tris-ClH 0.1M pH 7.3, 0.3M en -
ClNa y 10 mM en cisteína.

0.12 g./100 ml. de cisteína, calidad Sigma, en la so-
lución sin urea anterior.

III.- ESPECIFICIDAD BIOQUIMICA DE LAS FERREDOXINAS DE ESPINACA
Y LECHUGA.

1.- Operatividad frente a la nitrito reductasa.

La ferredoxina fotoreducida es el transportador natural de
electrones que actúa en la reducción de los nitritos a amonio
por la nitrito reductasa fotosintética (66).

La especificidad biológica de la ferredoxina en relación con este proceso se ensayó determinando la actividad nitrito reductasa del enzima de espinaca, actuando como transportador de electrones ferredoxinas de espinaca ó lechuga, en experiencias paralelas.

Los ensayos se realizaron según el método descrito - por Losada y Paneque (172) para la determinación de actividad nitrito reductasa. Este proceso es independiente de la luz, - actuando el ditionito como fuente de electrones y la ferredoxina como transportador de los mismos, determinándose el nivel de nitrito reductasa por dosificación colorimétrica del nitrito no reducido, una vez eliminado el ditionito en exceso por aireación forzada de la mezcla de reacción.

Si se mantienen constantes y en exceso los niveles de donador de electrones, enzima y sustrato, el método será apto para la dosificación de ferredoxina y, a igualdad ponderal de éstas, para determinar el nivel de operatividad en función de su origen en relación con el de la nitrito reductasa.

Hay que indicar que el colorante metilviológeno puede actuar como transportador artificial de electrones en sustitución de la ferredoxina, y en tal sentido lo hemos empleado - en aquellos procesos colaterales -control de purificación de - la nitrito reductasa, construcción de la curva patrón de nitrito- que, de otra forma, hubiesen implicado un gasto innecesario de ferredoxina.

1.1.- Determinación de nitrito. Curva patrón de nitrito.

El nitrito no reducido en la reacción enzimática se determina espectrofotométricamente siguiendo una modificación del método de Snell y Snell (173): los nitritos en medio ácido for

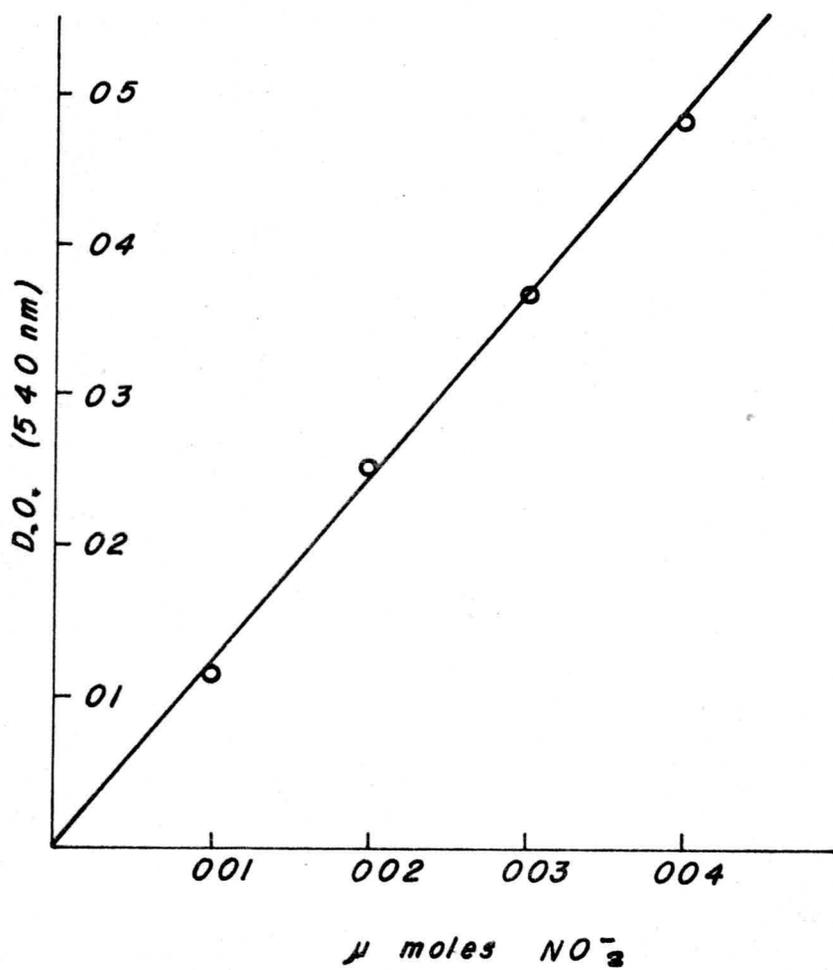


Fig. II

man con la sulfenilamida una sal de diazonio, que al reaccionar con una amina aromática -en este caso la N-(1-naftil) etilendiamina- forma un compuesto azóico rojo, medible a 540 nm.

La curva patrón se construyó con cuatro concentraciones distintas de nitrito que, para mayor exactitud, se encontraban en un medio análogo al que posteriormente se iba a usar para determinar la actividad nitrito reductasa.

1.1.1.- Metodica.

En una serie de 5 tubos de ensayo de 10 ml. se dispusieron los siguientes reactivos:

<u>Tubo nº</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>
Nitrito sódico 20 mM (ml)	---	0.05	0.10	0.15	0.20
Agua dest. (ml)	0.20	0.15	0.10	0.05	---
Buffer Tris-ClH 0.5M pH 8.0 (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Metilviológeno 5 mM (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Ditionito sódico al 2.5% (ml)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Buffer Tris-ClH 0.01M pH 8.0(ml)	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9

agitándose entonces fuertemente cada tubo (Whirlimixer) hasta decoloración total del metilviológeno, lo que indica que el ditionito se ha oxidado totalmente.

Se tomó 1 ml. de cada uno de los tubos y se diluyeron en matraz aforado hasta 100 ml. con agua dest.; de cada una de estas diluciones se pasaron entonces 2 ml. a sendos tubos de ensayo y se agregó 1 ml. de las soluciones de sulfanilamida y de N-(1-naftil)etilendiamina. Se llevó a un volumen final de 5 ml. por adición de 2 ml. de agua dest. y, pasados 10 min., se leyó la densidad óptica a 540 nm. usando como blanco el tubo 1. La curva standard se construyó llevando estos valores al eje de ordenadas, mientras que en el de abscisas se dispusieron las concentra

ciones correspondientes: 0.01, 0.02, 0.03 y 0.04 μ M de nitrito.

1.1.2.- Reactivos.

- Nitrito sódico 20 mM.

0.138 g./100 ml. de nitrito sódico, calidad Merck p.a.

- Buffer Tris-ClH 0.5M. pH 8.0.

Tris 1M (121.14 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.) . . . 250 ml

ClH 1M (82.9 ml./l. de ClH fumante $d = 1.19$, calidad Merck p.a.) 146 ml

Ajustar al pH indicado y llevar a 500 ml. con agua - dest.

- Metilviológeno 5 mM.

0.1286 g./100 ml. de metilviológeno, calidad Sigma.

- Ditionito sódico al 2.5%.

0.25 g./10 ml. de ditionito sódico, calidad Merck, - en CO_3HNa 0.29M (2.4363 g./100 ml. de bicarbonato sódico, calidad Merck p.a.). Esta solución se ha de preparar inmediatamente antes de su uso.

- Buffer Tris-ClH 0.01M pH 8.0.

Se obtiene diluyendo al 1/50 la solución 0.5M, y haciendo un ajuste al pH-metro en caso necesario.

- Sol. al 1% de sulfanilamida.

1 g./100 ml. de sulfanilamida, calidad Sigma, en ClH - 3N (24.8 ml/100ml de ClH fumante $d = 1.19$, calidad Merck p.a.)

- Sol. al 0.02% de N-(1-naftil) etilendiamina.

10 mg./50 ml. de N-(1-naftil) etilendiamina. 2ClH, - calidad Sigma.

1.2.- Test de la nitrito reductasa ferredoxin-dependiente.

Los ensayos se realizaron por triplicado y en paralelo con las ferredoxinas de espinaca y lechuga, frente a la nitrito reductasa de espinaca, aislada como posteriormente se dice.

Previamente se prepararon disoluciones en agua dest. de los liofilizados de ambas ferredoxinas, de tal forma que diesen un valor análogo leído al visible a 422 nm.; este valor se fijó en 9.6 de densidad óptica, lo que a la vista de los coeficientes de absorción molar calculados anteriormente representa una concentración de $1 \mu\text{M}/\text{ml}$. Para ello una alícuota de las soluciones preparadas se diluyó al 1/10 con agua dest., efectuándose las lecturas espectrofotométricas frente a un blanco de ésta; las soluciones originales se concentraron o diluyeron hasta que en estas condiciones se obtuvo un valor a 422 nm. de 0.96.

1.2.1.- Metodica.

La mezcla de incubación contenía los siguientes elementos:

Buffer Tris-ClH 0.5M pH 8.0	0.3 ml.
Ditionito sódico al 2.5%	0.3 ml.
Sol. de ferredoxina	0.2 ml.
Preparado de nitrito reductasa (0.25 unidades/ml.)	1 ml.

dispuestos en tubos de ensayo de 10 ml. Una vez preincubada la mezcla a 30° C, se inició la reacción agregando 0.2 ml. de sol. 20 mM de nitrito sódico también preincubada a dicha temperatura. Al cabo de 10 min. de incubación a 30° C se detuvo la reacción agitando vigorosamente los tubos en las condiciones fijadas anteriormente en la construcción de la curva standard. En un blanco

paralelo para cada ferredoxina la sol. de nitrito sódico estaba sustituida por un volumen equivalente de agua dest.

La dosificación del nitrito residual no reducido se efectuó análogamente a lo descrito en la construcción de la curva standard, llevando finalmente a ésta los valores de absorción obtenidos, y calculando por interpolación la cantidad de nitrito. Puesto que la cantidad de nitrito existente en cada ensayo era de $0.04 \mu\text{M}$, la diferencia entre este valor y el obtenido en cada caso por interpolación nos dará la cantidad de nitrito reducido por la acción enzimática, índice indicativo de la operatividad de la ferredoxina correspondiente.

1.2.2.- Reactivos.

Están especificados en el epígrafe anterior: "Determinación de nitrito. Curva patrón de nitrito". Además hay que incluir la nitrito reductasa, cuya preparación se consigna a continuación: A

.....
A.- Obtención del preparado enzimático de nitrito reductasa de espinga.

Se utilizó un preparado enzimático parcialmente purificado siguiendo la metódica descrita por Ramírez y col. (66) para el enzima de este mismo origen.

A.1.- Determinación de actividad nitrito reductasa metilviológico-dependiente.

La localización del enzima en los procesos cromatográficos de purificación, así como la dosificación de las unidades enzimáticas obtenidas en el preparado final, se realizó mediante el test que sustituye el transportador biológico de electrones ferredoxina, por el colorante de igual acción metilviológico.

En tubos de ensayo de 10 ml. se disponen:

Buffer Tris-ClH 0.5M pH 8.0	0.3 ml.
Ditionito sódico al 2.5%	0.3 ml.
Metilviológeno 5 mM	0.3 ml.
Preparado enzimático	0.9 ml.

agregándose al tiempo cero de reacción 0.2 ml. de nitrito sódico 20 mM. Por lo demás, la metódica es análoga a la indicada anteriormente para el test de la nitrito reductasa ferredoxin-dependiente, efectuándose finalmente el cálculo del nitrito residual por interpolación en la curva standard de nitrito.

Una unidad enzimática queda definida como la cantidad de enzima que cataliza la reducción de $1 \mu\text{M}$ de nitrito por min. bajo las condiciones indicadas.

A.2.- Metódica de purificación.

Todas las operaciones se realizaron a 4°C , salvo la precipitación acetónica que se llevó a cabo a -20°C en baño de hielo-sal. Los procesos cromatográficos se monitorizaron a 280 nm. en célula de flujo continuo (LKB, Uvicord II) de 3 mm. - de paso óptico, empleándose columnas Jobling de doble pistón, - en técnica descendente a un flujo, controlado mediante bomba - peristáltica (LKB, Recychrom), de 0.5 ml./min.

El método incluyó los siguientes pasos:

A.2.1.- Obtención de extractos crudos.

Espinacas frescas se despeciolaron y lavaron abundantemente al grifo, primero, y con agua dest. después, y - una vez secas sobre papel de filtro se llevaron a 4°C una noche para que adquirieran turgencia. Se eliminaron las nerviaciones prominentes y partieron en pequeños fragmentos. 500 g. de éstos se homogeneizaron durante 3 min. a velocidad tope (Sorvall, Omni

-mixer) con 500ml. de agua dest. filtrándose por triple capa de gasa de nylon. Al volumen obtenido -alrededor de 735 ml.- se - agregó la suficiente cantidad de buffer Tris-ClH 0.5M pH 8.0 - -unos 82 ml.- para conseguir una concentración final 0.05M en - Tris. Finalmente, se centrifugó a 12000 r.p.m. (23000 x g) du-- rante 20 min. (Sorvall Superspeed, RC2-B).

A.2.2.- Precipitación acetónica.

Al extracto anterior se agregó poco a poco, con agitación constante, suficiente cantidad de acetona fría a -20° C, calidad Merck p.a.; para conseguir una concentración en ésta del 35%. El material precipitado se eliminó por centrifugación a 4500 r.p.m. (3000 x g) durante 10 min., y al sobrenadante se continuó agregando acetona hasta concentración final del 75%. Se dejó reposar el precipitado durante 1 hora, eliminándose la mayor parte del sobrenadante por decantación; el resto se separó por centrifugación análoga a la anterior. Del precipitado - obtenido se eliminaron las últimas trazas de acetona haciendo - llegar sobre él, con agitación simultánea, una corriente de - aire frío mediante un secador de pelo, hasta que adopta una consistencia pulverulenta.

De este precipitado se extrajo la nitrito reductasa por suspensión, agitando durante 30 min. en 80 ml. de buffer - Tris-ClH 0.01M pH 8.0, centrifugando después a 12000 r.p.m. - (18.000 x g) durante 20 min. Finalmente, el sobrenadante se dig lizó en membrana de celofán durante una noche, con agitación y flujo continuo de solución dializadora, frente al mismo buffer de extracción anterior, separándose por centrifugación a 16500 r.p.m. (32.000 x g) durante 20 min. cualquier precipitado origi na do durante el proceso. Se obtuvieron así unos 160 ml. de solu ci ón.

A.2.3.- Eliminación de la ferredoxina.

Constituye el paso fundamental, ya que por ser éste el compuesto que interesa valorar, el preparado de nitrito reductasa ha de estar absolutamente exento de ferredoxina endógena.

A la solución anterior se agregó suficiente ClNa sólido, calidad Merck p.a., hasta obtener una concentración final 0.2M en Cl^- , pasándose entonces a través de una columna (4.5 x 3.8 cm.) de DEAE-52 celulosa, previamente equilibrada con buffer Tris- ClH 0.01M pH 8.0, hecho 0.194M en ClNa para conseguir una concentración final 0.2M en clóruros. La ferredoxina queda cuantitativamente fijada en la parte superior de la columna, apareciendo la nitrito reductasa en el eluido. Un arrastre completo de ésta se consiguió lavando la columna con 60 ml. adicionales del buffer de equilibración de la misma.

A.2.4.- Cromatografía sobre DEAE-celulosa.

El eluido anterior se diluyó al 1/10 con agua dest. pasándose después por una columna (5 x 3.8 cm.) de DEAE-52 celulosa, equilibrada con anterioridad en buffer Tris- ClH 0.01M pH 8.0. Un buen número de impurezas se eliminó eluyendo con dicho buffer hecho 0.094M en ClNa -lo que totaliza 0.1M en clóruros-, hasta conseguir una baja absorción; finalmente, la nitrito reductasa eluyó cuando la concentración en ClNa se incrementó a 0.294M, lo que representa una concentración final 0.3M en Cl^- . Se recogieron fracciones de 10 ml., mezclándose aquéllas que presentan positividad al test enzimático.

La técnica original de Ramírez y col.(66) aún incluye un nuevo paso sobre DEAE-celulosa para obtener el enzima en total estado de pureza. Nosotros, sin embargo, no lo hemos llevado a cabo por considerar que la nitrito reductasa ahora -

obtenida era lo suficientemente pura a los efectos requeridos.

En cualquier caso, el preparado obtenido se diluyó en agua dest. hasta conseguir el número de unidades enzimáticas/ml. requeridas para el test de la nitrito reductasa ferredoxina-dependiente.

A.3.- Reactivos.

Algunos se encuentran ya descritos en el epígrafe - "Determinación de nitrito. Curva patrón de nitrito". Por lo que respecta a la preparación de la DEAE-52 celulosa equilibrada - con los buffers indicados en la metódica, nos remitimos a lo - indicado en el mismo sentido al describir la purificación de - las ferredoxinas de espinaca y lechuga.

Otros reactivos serán:

- Buffer Tris-ClH 0.01M pH 8.0, ClNa 0.194M
(0.2M en Cl⁻).

11.35 g./litro de ClNa, calidad Merck p.a., en el -
buffer indicado.

- Buffer Tris-ClH 0.01M pH 8.0, ClNa . -
0.094M (0.1M en Cl⁻).

5.5 g./litro de ClNa, calidad Merck p.a., en el bu-
ffer indicado.

- Buffer Tris-ClH 0.01M pH 8.0, ClNa -
0.294M (0.3M en Cl⁻)

17.2 g./litro de ClNa, calidad Merck p.a., en el bu-
ffer indicado.

.....

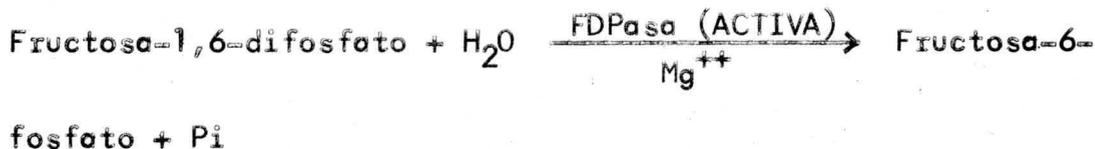
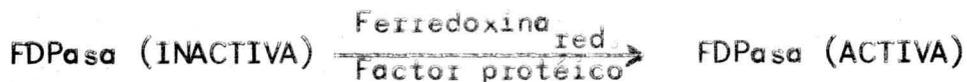
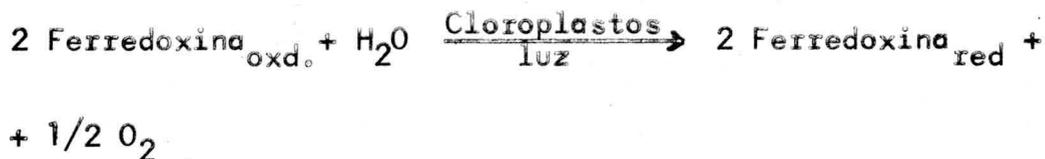
2.- Operatividad frente al sistema fructosa-1,6-difosfatasa.

La ferredoxina reducida es un activador natural de la fructosa-1,6-difosfatasa (FDPasa) fotosintética, enzima que cataliza la reacción:



Este constituye un complejo sistema que, en condiciones naturales, requiere para su acción la presencia de iones Mg^{++} , un "factor protéico" presente en los cloroplastos, y ferredoxina al estado reducido.

Según Buchanan (73) la ferredoxina oxidada existente en el cloroplasto sería reducida fotoquímicamente, actuando entonces junto con el "factor protéico" en la activación de la FDPasa por un mecanismo aún desconocido:



Este sistema se ha mostrado perfectamente operativo y, aunque con actividad disminuida, resulta también funcional cuando se reemplaza la ferredoxina por compuestos -SH de bajo potencial redox, especialmente ditiotreitól. Por otro lado, el -

sistema natural de fuente de electrones que, iniciándose en el agua, transcurre a través de la cadena de la fotofosforilación acíclica, puede también ser reemplazado por el sistema artificial ascorbato-diclorofenolindofenol (DPIP).

De ambos hechos se hace uso, como veremos, en la práctica. En cualquier caso, la medida de la operatividad de este sistema se ha hecho por cuantificación del fosfato inorgánico dejado en libertad.

2.1.- Determinación de fósforo inorgánico. Curva patrón de fosfatos.

Se ha seguido una modificación del método original de Fiske y Subbarow (174). El ortofosfato produce con el reactivo sulfomolibdico un fosfomolibdato que, por reducción en este caso con sulfito e hidroquinona, forma un azul de molibdeno con máximo de absorción a 640 nm., mensurable espectrofotométricamente.

2.1.1.- Metodica.

En una batería de 10 tubos de ensayo se adicionó, al primero 1 ml. de agua dest., y a los siguientes 1 ml. de cada una de las soluciones patrón de fosfato monopotásico. Se añadieron entonces 1 ml. de reactivo sulfomolibdico, 1 ml. de sol. de sulfito y 1 ml. de sol. de hidroquinona. A los 10 min. de esta última adición se hizo la lectura a 640 nm., tomando como blanco el tubo primero.

Los valores de absorción obtenidos se llevaron a ordenadas en un sistema coordinado, representándose en abcisas las correspondientes concentraciones de fósforo.

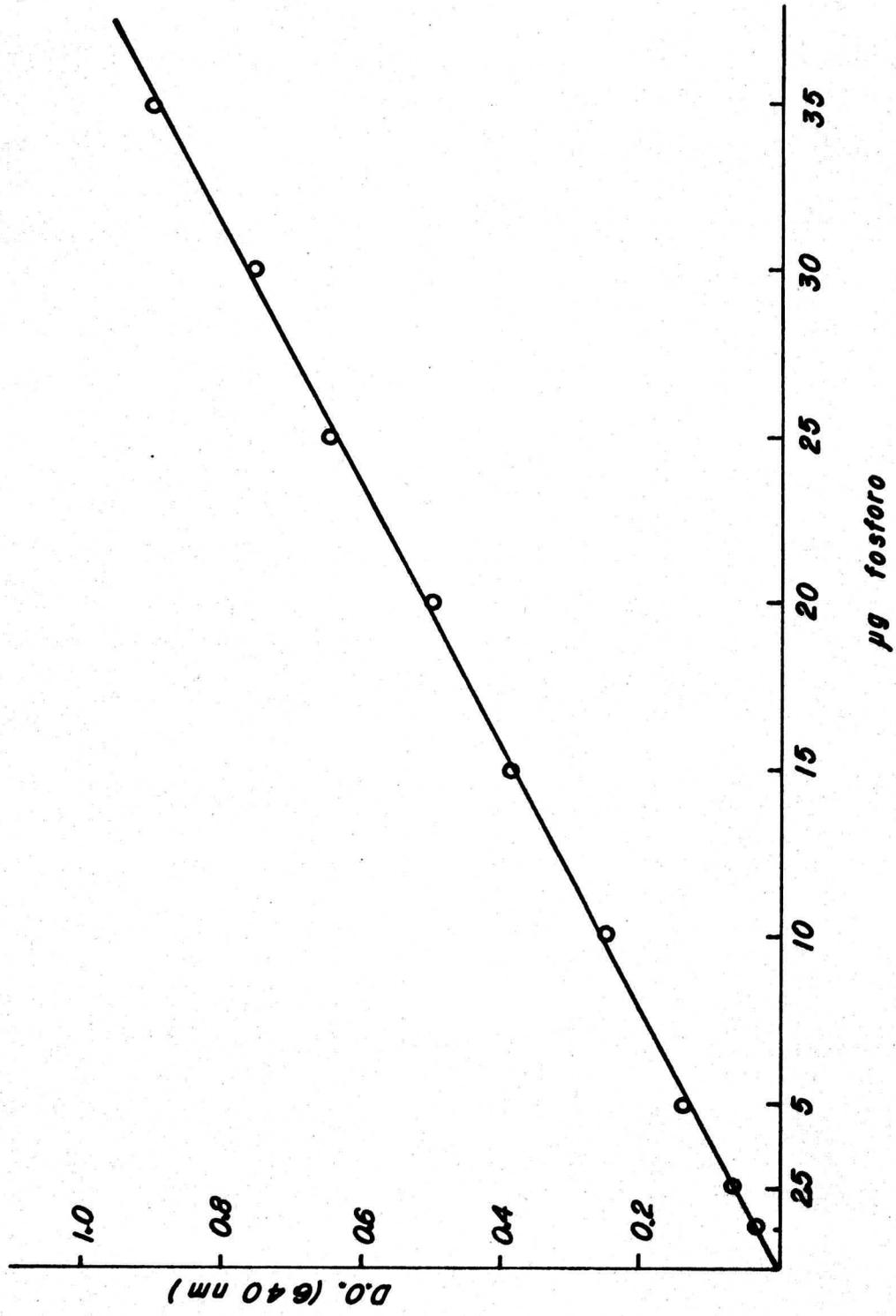


Fig.12

2.1.2.- Reactivos.

- Sol. madre de fosfato monopotásico.

4.394 g./l. de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, calidad Merck p.a. Esta solución contiene 1 mg./ml. de fósforo.

- Soluciones patrón de fosfato monopotásico.

De la solución anterior tomar 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 ml. y llevar a 1000 ml. con agua dest. Estas soluciones contienen, respectivamente, por ml. 1.25, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 μg . de fósforo.

- Reactivo sulfomolibdico.

5 g./100 ml. de molibdato amónico tetrahidratado, - calidad Merck p.a., en mezcla ácido sulfúrico conc. $d = 1.84$ - (calidad Merck p.a.): agua (15:85 v/v).

- Sol. de sulfito sódico.

20 g./100 ml. de sulfito sódico, calidad Merck p.a. en agua dest. acidulada con unas gotas de sulfúrico conc. Es de preparación extemporánea.

- Sol. de hidroquinona.

1 g./100 ml. de hidroquinona, calidad Merck, en agua dest. acidulada con unas gotas de sulfúrico conc. Es de preparación extemporánea.

2.2.- Ensayo de actividad fructosa-1,6-difosfatasa ferredoxina-dependiente.

Análogamente a lo indicado para la nitrito reductasa se ensayaron comparativamente las ferredoxinas de espinaca y - lechuga en relación con la actividad fructosa-1,6-difosfatasa del sistema FDPasa-Factor protéico procedente de espinaca. La mezcla de reacción incluye también fragmentos lisados y lavados

de cloroplastos de espinaca como fuente del complejo fotoquímico de reducción de la ferredoxina, actuando el par ascorbato-DPIP como donador de electrones. El sistema es estrictamente dependiente de concentraciones fisiológicas de Mg^{++} , viéndose su actividad estimulada en presencia de compuestos con grupos -SH libre, tipo glutatión. Finalmente, la reacción se verifica en un medio taponado a pH 8.0, en presencia de EDTA como protector frente a trazas de metales pesados. La reacción se llevó a cabo en anaerobiosis, a 20° C y bajo iluminación.

2.2.1.- Metodica.

Los ensayos se efectuaron por triplicado para cada una de las ferredoxinas, con preparados de análoga concentración. Para ello se disolvieron en agua dest. las ferredoxinas puras liofilizadas, de tal forma que se obtuvieran soluciones de idéntica absorción a 422 nm, a un nivel de densidad óptica del orden de 1.0, lo que -según se dedujo anteriormente a la luz de los respectivos coeficientes de absorción molar- corresponde a concentraciones en ferredoxina del orden de 1.25 mg./ml.

En el compartim ento principal de una cubeta anaeróbica tipo Thumberg de 3ml. de capacidad se dispusieron:

Buffer Tris-ClH 0.66M pH 8.0	100 μ l.
EDTA 1.32 mM	50 μ l.
Cl ₂ Mg 20 mM	50 μ l.
DPIP 1.3 mM	50 μ l.
Ascorbato 133 mM	50 μ l.
Glutatión red. 70 mM	50 μ l.
Sol. de FDPasa	250 μ l., conteniendo 25 μ g. de proteína.

Sol. de Factor protéico 250 μ l., conteniendo 0.2 mg. de proteína.

Sol. de ferredoxina 50 μ l.

En el brazo lateral se colocaron, por otro lado:

Fructosa-1,6-difosfato 80 mM 50 μ l.

Suspensión de cloroplastos 50 μ l., equivalentes a 0.065 mg. de clorofila.

Se congeló entonces el contenido del compartimento principal a -12° C, efectuándose después por la tubuladura lateral un vacío progresivo hasta alcanzar los 15 micrones. Una vez sellada la célula se descongeló y estabilizó a 20° C, en cuyo momento se pasó el contenido del brazo lateral al compartimento principal. La cubeta se montó entonces en el compartimento termostatzado a 20° C, sometiéndose durante 30 min. a una iluminación de 10000 lux en el dispositivo ya anteriormente descrito (1). Pasado ese tiempo se detiene la reacción des haciendo el vacío y agregando 0.5 ml. de sol. de á. tricloroacético. Se pasa el contenido de la cubeta a un tubo de centrifuga, y se centrifuga a 5000 r.p.m. (2800 x g) durante 3 min. Del sobrenadante se pasa 1 ml. a un tubo de ensayo, y se dosifica el fosfato inorgánico liberado según la técnica más arriba descrita. Un blanco paralelo se preparó con 1 ml. de agua dest.

La absorción obtenida se lleva a la curva standard de fosfatos, y se calcula por interpolación el fosfato liberado. Este valor es indicativo de la efectividad de ambas ferredoxinas en las condiciones indicadas. Conviene, no obstante, - indicar aquí la falta de valor cuantitativo en el sentido más

estricto de este método, hecho ya indicado por Buchanan y col. (175), y fácilmente comprensible si se tiene en cuenta el carácter muy complejo y algo empírico de esta reacción, en la que el papel del "factor protéico" está aún poco aclarado.

2.2.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.66M pH 8.0

Tris 1.32M (159.9 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.) ..

.. . . . 50 ml.

ClH 1.32M (109.4 ml./l. de ClH fuamnte d= 1.19, calidad - Merck p.a.) . 29.2 ml.

Se ajusta al pH-metro y se lleva a 100 ml. con agua dest.

- Sol. de EDTA 1.32 mM.

0.049 g./100 ml. de EDTA disódico dihidratado, calidad Merck p.a.)

- Sol. de Cl_2Mg 20 mM.

0.406 g./100 ml. de $Cl_2Mg \cdot 6H_2O$, calidad Merck p.a.

- Sol. de diclorofenol indofenol, (DPIP) 1.3 mM.

3.8 mg./10 ml. de 2,6-diclorofenol-indofenol, calidad Sigma.

- Sol. de ascorbato 133 mM.

0.2653 g./10 ml. de ascorbato sódico, calidad Sigma.

- Sol. de glutathion red. 70 mM.

24.5 mg./ml. de glutathion reducido, calidad Sigma.

- Sol de fructosa-1,6-difosfato 80 mM.

44.0 mg./ml. de fructosa-1,6-difosfato sal trisódica octohidrato, calidad Boehringer.

- Sol. de ácido tricloroacético al 5%.

Además, hay que considerar como reactivos las soluciones de FDPasa, "Factor protéico" y suspensión de fragmentos de cloroplastos, cuya preparación se describe a continuación: A-B y C.

.....

A.- Obtención de preparados purificados de fructosa-1,6-difosfatasa.

Hemos utilizado el método desarrollado en nuestro laboratorio por Lázaro y col. (176). Como en casos anteriores, todas las operaciones se efectuaron a 4º C, siguiéndose el contenido de los procesos cromatográficos a 280 nm. en célula de flujo continuo de 3mm. de paso óptico (LKB, Uvicord II). Estos se llevaron a cabo en columnas cromatográficas Jobling de doble pistón, a un flujo constante de 0.5 ml./min. en técnica descendente, mediante impulsión con bomba peristáltica (LKB, Recychrom). Las centrifugaciones se realizaron también a 4º C en centrífuga refrigerada Sorvall Superspeed, mod. RC-2-B.

En cada paso se siguió un control de contenido protéico por el método de Lowry -descrito con anterioridad- y de actividad FDPasa de acuerdo con la técnica que más adelante se detalla.

A.1.- Metodica.

La purificación consta de los siguientes pasos:

A.1.1.- Preparación de extractos crudos de hojas.

Se utilizaron lotes de 5 Kg. de espinacas frescas que, una vez desprovistas de los peciolo, se lavaron abundantemente con agua de grifo, y con agua dest. después. Se secaron sobre papel de filtro y guardadas en bolsas de plas

tico, se dejaron alcanzar un estado de turgencia manteniéndolos en frigorífico a 4° C durante una noche. Se separaron luego las nerviaciones prominentes y se cortaron en pequeños fragmentos.

Este material se homogeneizó (Sorvall, Omni-mixer) - con buffer Tris-ClH 0.025M pH 7.5, Cl₂Mg 5 mM (1:1 p/v) durante 1 min. a velocidad tope, filtrándose luego a través de triple - capa de gasa de nylon. Finalmente, se centrifugó a 11000 r.p.m. (20000 x g) durante 30 min.

A.1.2.- Precipitación térmica.

El extracto obtenido -alrededor de 2700 ml- se sometió a un calentamiento a 60° C durante 30 min. Se enfrió - inmediatamente en baño de hielo, y se centrifugó a 5000 r.p.m. (2800 x g) durante 10 min., rechazándose el abundante material sedimentado.

A.1.3.- Fraccionamiento con sulfato amónico.

Al sobrenadante anterior se agregó EDTA disódico, calidad Merck p.a., y cisteína, calidad Sigma, hasta concentraciones finales respectivas 6.4 y 10 mM. Se adicionó entonces poco a poco y con agitación constante, sulfato amónico finamente pulverizado, calidad Merck p.a., hasta una concentración final del 30% de saturación (164 g. por litro de solución). Se dejó reposar 30 min. y se centrifugó a 5000 r.p.m. (2800 x g) durante 20 min., desechándose el sedimento. Medido el volumen de sobrenadante se siguió adicionando sulfato amónico sólido hasta concentración final del 70% de saturación (249 g. por litro de solución al 30%). El material precipitado se recogió por centrifugación análoga, disolviéndose luego en unos 40 ml. de buffer acético-acetato 0.05M pH 5.5, manteniéndolo en maceración con agitación durante una noche. Después se centrifugó durante 20 - min. a 5000 r.p.m. (2800 x g.), eliminando la fracción no extraí

da.

A.1.4.- Filtración por Sephadex G-100.

La solución se pasó a través de una columna (3.8 x 55 cm.) de Sephadex G-100, previamente equilibrada con buffer acético-acetato 0.05M pH 5.5. La elución se efectuó con el mismo buffer, recogién dose fracciones de 10 ml. y reuniendo aquéllas que mostraron actividad enzimática. El enzima eluía en cabeza, después del volumen de exclusión.

A.1.5.- Filtración por Sephadex G-200.

La solución anterior -unos 240 ml.- se pasó en varios lotes por una columna (3.8 x 55 cm.) de Sephadex G-200, equilibrada y luego eluida en las mismas condiciones anteriores. El enzima eluía ahora al final del material protéico total.

A.1.6.- Cromatografía sobre DEAE-celulosa.

Las fracciones reunidas del paso anterior -unos 470 ml.- se pasaron a través de una columna (2 x 15 cm.) de DEAE-52 celulosa, equilibrada también en el buffer acetato anterior. La FDPasa quedaba fijada cuantitativamente, procediéndose a su elución con dicho buffer hecho 1M en ClNa. Se recogieron fracciones de 5 ml. y, reunidas las que mostraban actividad FDPasa, se dializaron durante una noche, en flujo continuo y con agitación constante, en saco de celofán frente al buffer acético-acetato 0.05M pH 5.5.

El enzima así preparado es homogéneo a la electroforesis en gel de acrilamida, conservándose perfectamente durante meses por congelación a -12° C. En el momento de su uso se diluyó en caso necesario, hasta la concentración deseada con el mismo buffer de diálisis.

A.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.025M pH 7.5, Cl₂Mg -
5 mM.

Tris 0.05M (6.057 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.) . .
. 500 ml.

ClH 0.05M (4.1 ml./l. de ClH fumante d= 1.19, calidad Merck
p.a.) 403 ml.

Se ajusta al pH-metro y se lleva a 1000 ml. con agua
dest. Finalmente, se disuelve Cl₂Mg. 6H₂O, calidad Merck p.a.,
a la concentración 1.015 g./l.

- Buffer acético-acetato 0.05M pH 5.5 .

Acetato sódico 0.05M (6.805 g./l. de acetato sódico.3H₂O,
calidad Merck p.a.) 885 ml.

Acido acético 0.05M (2.85 ml./l. de ácido acético glacial,
calidad Merck p.a.) 1000 ml.

Ajustar al pH-metro con una u otra solución.

- Buffer acético-acetato 0.05M pH 5.5, -
ClNa 1M.

58.5 g./l. de ClNa, calidad Merck p.a., en el buffer
anterior.

En relación con la preparación de Sephadex G-100 y -
G-200, y de DEAE-52 celulosa, nos remitimos a lo indicado en -
ocasiones anteriores.

A.3.- Dosificación de la actividad fructosa-1,6-difosfata
sa.

Se ha efectuado por determinación del fosfato inor-
gánico liberado. Sin embargo, por razones de economía del mate-
rial y de tiempo, y a diferencia de la dosificación de activi-
dad FDPasa ferredoxina-dependiente, se ha hecho uso de la pro-

piedad de este enzima de mostrar actividad en presencia de altas concentraciones de Mg^{++} y en ausencia de ferredoxina y "Factor protéico" (177) (178) (73), lo que representa una gran simplificación en las determinaciones de rutina.

A.3.1.- Metódica.

En tubos de centrífuga de 5 ml. de capacidad se dispusieron:

Buffer Tris-ClH 0.2M pH 8.8	0.5 ml.
EDTA 16 mM	0.2 ml.
Cl_2Mg 50 mM	0.2 ml.
Cisteína 50 mM	0.2 ml.
Fructosa-1,6-difosfato 20 mM	0.4 ml.

Una vez estabilizados a 28° C se adicionó a cada uno, a tiempo cero, 0.5 ml. de preparado enzimático. La incubación se mantuvo a 28° C durante 30 min., pasados los cuales se detuvo la reacción adicionando 1 ml. de sol. al 5% de ácido tricloroacético. Otro tubo -el considerado como blanco- se preparó de forma análoga, sustituyendo el preparado enzimático por un volumen análogo de agua dest. Los tubos se centrifugaron a 5000 r.p.m. (2800 x g) durante 10 min., determinándose sobre 1 ml. -de sobrenadante la cantidad de fosfato inorgánico liberado, de acuerdo con la técnica colorimétrica más arriba señalada.

El valor de absorción leído se llevó a la curva standard de fosfatos, donde por interpolación se calculó el fósforo inorgánico liberado. De acuerdo con el volumen de sol. enzimática tomada para la determinación, la cantidad de fosfato liberado por 1 ml. de preparado enzimático se obtendrá multiplicando por 6 el valor deducido de la curva patrón.

Una unidad de FDPasa queda definida como la cantidad de enzima que libera 1 μM de fosfato inorgánico por min. en las

condiciones indicadas de ensayo.

A.3.2.- Reactivos.

- Buffer Tris-ClH 0.2M pH 8.8.

Tris 0.4M (48.456 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.) . . .
. 500 ml.

ClH 0.4M (33.1 ml./l. de ClH fumante $d = 1.19$, calidad Merck
p.a.) 85 ml.

Ajustar el pH y llevar a 1000/ml. con agua dest.

- Sol. de EDTA 16 mM.

0.596 g./100 ml. de EDTA disódico dihidrato, calidad
Merck p.a.

- Sol. de Cl_2Mg 50 mM.

1.016 g./100 ml. de $Cl_2Mg \cdot 6H_2O$, calidad Merck p.a.

- Sol de cisteína 50 mM.

60.6 mg./10 ml. de cisteína, calidad Sigma.

- Sol. de fructosa-1,6-difosfato 20 mM.

11 mg./ml. de fructosa-1,6-difosfato sal trisódica -
octohidrato, calidad Boehringer,

- Sol. de ácido tricloroacético al 5%.

↙ B.- Obtención de preparados purificados de "factor protéi
co".

Hemos seguido el método de Buchanan y col (73), con -
algunas modificaciones introducidas por nosotros (179).

Todas las circunstancias que conciernen a la tempera
tura de las operaciones, fases cromatográficas en columna, cen
trifugaciones, etc., son las tantas veces indicadas en relación

con la purificación de proteínas.

Un control de contenido protéico según Lowry, y de funcionalidad del "Factor protéico" -de acuerdo con la técnica que más adelante se indica-, se siguió en cada una de las fases de purificación.

B.1.- Metodica.

El proceso de purificación consta de los siguientes pasos:

B.1.1.- Preparación de extractos crudos.

Espinacas frescas, lavadas y secas, sin peciolos y nerviaciones principales, se mantuvieron durante la noche a -20° C. 500 g. de estas hojas congeladas se homogeneizaron durante 3 min. a velocidad máxima (Sorvall, Omni-mixer) con 500 ml. de agua dest., a los que se adicionaron 5 ml. de solución 1M de PO_4HK_2 , suficiente para dar un pH final de 7. El homogenizado se filtró a través de gasa de nylon y se centrifugó a 9000 r.p.m. ($13.000 \times g.$) durante 5 min.

B.1.2.- Precipitación a pH 4.5.

El extracto crudo anterior -alrededor de 650 ml.- se llevó a pH 4.5 adicionando lentamente y con agitación ácido fórmico 1N. La fracción precipitada contiene la mayor parte de la actividad FDPasa, y se eliminó por centrifugación a 8500 r.p.m. ($12000 \times g.$) durante 5 min; el sobrenadante se neutralizó a continuación ajustándolo a pH 7 con solución 1M de Tris.

B.1.3.- Precipitación acetónica.

Al sobrenadante anterior neutralizado -unos 630 ml.- se agregó lentamente y con agitación constante acetona -

preenfriada a -20° C, calidad Merck p.a., hasta una concentración final del 75% en acetona. Se dejó sedimentar durante 1 hora, decatándose entonces la mayor parte del sobrenadante. El resto se separó centrifugando a 2500 r.p.m. (1000 x g.) durante 3 min., recogiendo el precipitado suspendiéndolo en 20 ml. de buffer Tris-ClH 0.03M pH 8.0.

La suspensión obtenida se dializó en saco de celofán, tratado previamente con solución de EDTA 1 mM, frente al mismo buffer de extracción, durante 24 horas con agitación y renovación constante del mismo. El material precipitado durante la diálisis se eliminó por centrifugación a 10500 r.p.m. (13.000 x g.) durante 15 min.

Aunque la técnica original de Buchanan y col. (73) - hace una purificación más exhaustiva, el preparado ahora conseguido tiene los suficientes criterios de pureza como para poder ser utilizado en el test de actividad FDPasa ferredoxina-dependiente, ya que se encuentra absolutamente exento de ferredoxina, y presenta solo trazas de FDPasa y Mg^{++} .

B.2.- Reactivos.

- Sol. de PO_4HK_2 1M.
22.823 g./100 ml. de $PO_4HK_2 \cdot 3H_2O$, calidad Merck p.a.
- Sol. de ácido fórmico 1N.
3.8 ml./100 ml. de ácido fórmico, calidad Merck p.a.
- Sol. de Tris 1M.
12.114 g./100 ml. de Tris, calidad Merck p.a.
- Buffer Tris-ClH 0.03M pH 8.0.
Tris 0.06M (7.2684 g./l. de Tris, calidad Merck p.a.) . . .
. 500 ml.

ClH 0.06M (4.9 ml./l. de ClH fumante d= 1.19, calidad Merck p.a.) 292 ml.

Ajustar al pH-metro (Beckman-Expandomatic), y llevar a 1000 ml. con agua dest.

- Sol. de EDTA 1 mM.

0.372 g./litro, de EDTA sal disódica dihidrato, calidad Merck p.a.

B.3.- Test de operatividad del "factor protéico".

Como anteriormente ya se apuntó, la FDPasa resulta operativa en presencia de "factor protéico" y de bajos niveles de Mg^{++} , aún en ausencia de ferredoxina y del sistema fotoquímico que la reduce, cuando ésta es sustituida por ditiotreitól. La complejidad del sistema queda así muy disminuida, máxima te niendo en cuenta que en tales circunstancias el test no nece si ta efectuarse en condiciones anaeróbicas.

B.3.1.- Metodica.

En tubos de centrifuga de 5 ml. se disponen:

Buffer Tris-ClH 0.66M pH 8.0	0.2 ml.
EDTA 1.32 mM	0.1 ml.
Cl_2Mg 20 mM	0.1 ml.
Ditiotreitól 33 mM	0.2 ml.
Albúmina sérica bovina	0.3 ml.
Sol. de FDPasa	0.5 ml., contenien do 50 μ g de proteí na.

Sol. de "factor protéico" 0.5 ml.,
contenien-
do 0.4 mg.
de proteí-
na.

Se preincubó la mezcla a 22° C, y se inició la reac-
ción adicionando a cada tubo 0.1 ml. de fructosa-1,6-difosfato
80 mM. La incubación se mantuvo a 22° C durante 30 min., dete-
niéndose la reacción por adición de 1 ml. de ácido tricloroacé-
tico al 5%. Un blanco paralelo se preparó sustituyendo el "fac-
tor protéico" por un volumen análogo de agua dest.

La dosificación del fosfato inorgánico liberado, así
como los cálculos siguientes se hace según se ha señalado repe-
tidas veces.

B.3.2.- Reactivos.

La mayor parte ya se han descrito al hablar del
"Ensayo de actividad fructosa-1,6-difosfatasa ferredoxina-depen-
diente". Además, hay que incluir:

- Sol. de ditiotreitól 33 mM.

5.1. mg./ml. de ditiotreitól, calidad Sigma.

- Sol. de albúmina sérica bovina.

1mg./ml. de albúmina sérica bovina, calidad Calbio-
chem.

C.- Preparación de suspensión de fragmentos de cloroplastos.

La obtención de suspensión de fragmentos de cloroplas-
tos lisados y lavados se realiza según se describe anteriormente
en "Operatividad según el test de la ferredoxin-NADP-reducta-

sa". Análogamente su dosificación atendiendo al contenido en -
clorofila.

.

3.- Operatividad frente a la ferredoxin-NADP-reductasa.

El fundamento y metódica del ensayo, así como preparación de reactivos, se describen detalladamente con anterioridad como "test de operatividad de la ferredoxina". No se insiste aquí - en ello, salvo que se realizó por triplicado con las ferredoxinas de espinaca y lechuga, frente a la ferredoxin-NADP-reductasa ligada al resto estromático de cloroplastos de espinaca.

Las soluciones de ambas ferredoxinas se prepararon - por disolución en agua dest. de los liofilizados correspondientes, a concentraciones idénticas del orden de 10 mg./ml. Estas se ajustaron por lectura espectrofotométrica a 422 nm. de una dilución al 1/10 de las soluciones a utilizar, que a la luz de los coeficientes de absorción descritos, darían una lectura de 0.8 unidades de densidad óptica para la concentración arriba - indicada.

La pendiente inicial de la curva de cinética nos dará un índice indicativo de la operatividad de ambas ferredoxinas.

RESULTADOS

I.- PREPARACION DE FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.

Como se ha indicado anteriormente, lotes de 8 kg. y 3 kg. de hojas de lechuga y espinaca suministraron, respectivamente, por término medio 2300 y 1600 ml. de extracto crudo. A continuación se detallan las circunstancias y evolución cuantitativa, como ejemplo de los numerosos efectuados, de un proceso de purificación partiendo de uno y otro material.

En las figuras 13 y 14 se esquematizan, dentro de la metódica de purificación expuesta, los análisis del eluido cromatográfico en columna de DEAE-52 celulosa, y de filtración molecular en columna de Sephadex G-75, respectivamente, en el proceso de aislamiento de la ferredoxina de espinaca. Y, análogamente, en las Figuras 15 y 16 los esquemas correspondientes a los mismos pasos para la ferredoxina de lechuga.

Comparando los esquemas de elución en DEAE-celulosa se observa para ambas especies un cierto paralelismo hasta el momento de elución de las correspondientes ferredoxinas, quedando entonces fijada en el cambiador mayor cantidad de proteína

extraña en el caso de la lechuga, que se libera cuando se prolonga la elución con la solución 0.37M en Cl^- . Este hecho indica una mayor efectividad de este paso para la ferredoxina de lechuga que para la de espinaca, como se observa comparando el número de veces purificada que, con relación al extracto crudo y al paso inmediatamente anterior, aparecen en este punto ambas ferredoxinas. La diferencia en los volúmenes de elución, mayor para la proteína de lechuga, viene motivada por la mayor longitud de la columna en ésta.

Por el contrario, los esquemas de elución en Sephadex G-75 son completamente análogos, con una cantidad de ferredoxina eluída del mismo orden. El mayor número de veces de purificación de la ferredoxina de lechuga que la de espinaca, respecto a los correspondientes extractos crudos de partida, se explica por la menor cantidad de ferredoxina existente en lechuga - en relación a la proteína bruta del mismo. Puede también comprobarse una similitud en los volúmenes de elución, lo que habla en favor de magnitudes moleculares análogas.

La homogeneidad y pureza de las ferredoxinas aisladas queda de manifiesto por las altas razones A_{422}/A_{274} - que en los preparados más puros eran de 0.49 y 0.46 para las procedentes de espinaca y lechuga, respectivamente- obtenidas, comparables como luego veremos a las registradas para ferredoxinas de otros vegetales. Además, la electroforesis en gel de poli-acrilamida, seguida de tinción específica de hierro no hemínico - mostró, como puede observarse en la Fig.17, la presencia de una sola fracción coloreada con ambas ferredoxinas; en la misma figura aparece también el revelado con negro de amido del desarrollo electroforético de la ferredoxina de espinaca.

En las Tablas VIII y IX se expone la evolución del -

proceso de purificación de ferredoxinas de espinaca y lechuga, respectivamente, con indicación del valor A_{422}/A_{274} a partir del momento en que se alcanza una relativa pureza, y de los rendimientos finales obtenidos.

La Fig.18 muestra una microfotografía a x1000 aumentos del preparado cristalizado de ferredoxina de lechuga, en la que se observan cristales aislados en forma de agujas. La Fig.19 constituye otro campo de la misma preparación anterior, a un aumento de x1250, en que aparecen los cristales con su clara tendencia a agruparse en haces escobiformes. Finalmente, la Fig.20 es el mismo campo anterior, a los mismos aumentos, pero usando luz polarizada como fuente de iluminación, a fin de poner inequívocamente de manifiesto la naturaleza cristalina del material aislado.

II.- CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS DE LAS FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.

1 y 2.- Espectros de absorción visible-UV.- Coeficientes de absorción molar.

Las figuras 21 y 22 recogen los espectros de absorción visible-UV de las ferredoxinas de espinaca y lechuga, a velocidad de registro de 20 mm./min. y ampliación de escala x2. La Fig.23 es un espectro de ferredoxina de lechuga, hecho a mayor concentración de proteína y a una velocidad de barrido de 60 mm./min., para precisar finamente los máximos de absorción en la zona del visible; entre las longitudes de onda 600 y 370 nm. se usó una ampliación de escala x2, siendo necesario reducirla a x1 = 2 unidades de extinción por todo el an-

cho de la carta— a partir de este valor, para evitar la pérdida del registro. Con ambas proteínas los máximos de absorción aparecen a las longitudes de onda 466 y 422 nm., en el visible y 330 y 274 nm., en el UV.

En las Figuras 24 y 25 se dan los espectros de las ferredoxinas de espinaca y lechuga en estados sucesivos de reducción, hasta que ésta es total. En la Fig. 25 se registra también, para la proteína de lechuga, el espectro de reducción total, irreversible, conseguido con un gran exceso de agente reductor. Como puede observarse, la absorción al visible en ambos máximos baja por reducción a menos de la mitad en una y otra ferredoxina, siendo el blanqueo casi total en la reducción irreversible con exceso de ditionito. Las razones de absorción $A_{\text{oxd.}}/A_{\text{red.}}$ no pudieron determinarse en los máximos a 330 y 274 nm. por la fuerte absorción que el ditionito muestra al UV.

La Tabla X recapitula las características espectrales obtenidas para ambas ferredoxinas.

3.- Determinación del punto isoeléctrico.

En la Tabla XI se recogen los valores de pH y absorción a 422 nm. de cada una de las fracciones eluidas de los tubos electroforéticos, una vez concluida la focalización. Tanto con la ferredoxina de espinaca como con la de la lechuga la focalización conseguida no es lo concisa que lo habitual en esta técnica, pero era imposible prolongar por mas tiempo el proceso electroforético, dada la rápida tasa de deterioro.

Las figuras 26 y 27 muestran la representación gráfica del proceso anterior, con superposición de las rectas de regresión obtenidas de los datos experimentales. La forma sinusoidal configurada por los valores de pH es típica del electroen-

foque, debiéndose a la distorsión que en el gradiente introducen las soluciones ácida y alcalina de los electrodos. Por interpolación en las respectivas rectas de regresión se obtuvieron para el punto isoeléctrico los valores 4.4 y 4.7, respectivamente, para las ferredoxinas de espinaca y lechuga.

4.- Potencial de óxido-reducción.

En la Tabla XII se indican los valores de absorción a 740 y 422 nm. de una solución 0.1 mM de metilviológeno, desde las condiciones de una total reducción por ditionito en anaerobiosis, hasta la oxidación total, pasando por estados intermedios de reducción obtenidos por admisiones sucesivas de aire. Se indican también las relaciones de absorción A_{740}/A_{422} para cada estado, con cálculo final de la media, que resultó ser 1.25. Puede también observarse que en estado de total reducción la absorción a 740 nm. es de 0.210, siendo nula la absorción de la forma oxidada.

La determinación de la diferencia de absorciones a 422 nm. entre las formas 100% oxidada y 100% reducida, por unidad de absorción de la forma oxidada, se determinó para ambas ferredoxinas en solución aproximadamente 0.1 mM, obteniéndose los siguientes valores:

	<u>Espinaca</u>	<u>Lechuga</u>
100% oxidado	$A_{422} = 0.967$	$A_{422} = 0.962$
100% reducido	$A_{422} = 0.463$	$A_{422} = 0.467$
$\frac{A_{100\% \text{ ox.}} - A_{100\% \text{ red.}}}{A_{100\% \text{ ox.}}}$	0.521	0.514

La Fig.28 recoge los registros intermitentes de las absorciones a 422 y 740 nm., en distintas situaciones de equilibrio por sucesivas admisiones de aire; la solución de metil-

viológeno era exactamente 0.1 mM, y aproximadamente de la misma concentración la de ferredoxina de lechuga. Las dos primeras lecturas corresponden a situaciones de total reducción efectuadas con un intervalo de 10 min., como control de la hermeticidad del cierre de la cubeta. Para el cálculo se tomaron sólo dos medidas en cada experiencia, correspondientes a la 2^a y 3^a admisiones de aire. Las anteriores a éstas presentaban dificultades en la cuantificación de la ferredoxina, dada la baja tasa de ferredoxina oxidada presente. Las posteriores llevaban implícito un error en la medida a 740 nm. -como fácilmente puede observarse en la figura-, a consecuencia de la turbidez que adquieren las soluciones de ditionito con el tiempo.

Las Tablas XIII y XIV muestran la evolución de esta compleja determinación con ferredoxinas de espinaca y lechuga, respectivamente. Teniendo en cuenta que se efectuaron dos experiencias con cada ferredoxina, y que en cada una de ellas se analizaron dos situaciones de equilibrio, se obtuvieron en total cuatro valores de potencial redox para cada ferredoxina, a partir de las cuales se calculó la media.

5.- Determinación del peso molecular.

En la Fig.29 aparecen superpuestos los registros de elución a 280 nm. de la ferredoxina de lechuga, y de los standard cromo C, mioglobina y quimotripsinógeno A, de los tubos en que se efectuó la centrifugación en gradiente. En todos ellos puede observarse la ancha banda de elución, consecuencia de la alta difusibilidad derivada del bajo peso molecular de estos compuestos.

Aplicando las expresiones indicadas en Parte Experimental, hemos obtenido para ambas ferredoxinas un peso molecu-

lar de 12380, cuando se comparan sus bandas de elución con la del citocromo C, standard con la posición de sedimentación más próxima a la de las ferredoxinas, y con un volumen específico parcial muy próximo al descrito para otras ferredoxinas tipo 2Fe. Análogamente, el coeficiente de sedimentación $S_{20,W}$ en relación con el dicho standard ha resultado ser de 1.74 S.

La determinación del peso molecular atendiendo al contenido en hierro (ver Tabla XVIII), da un valor de 6090 y 6530 por mol de hierro, para las ferredoxinas de espinaca y lechuga, respectivamente. Y, puesto que los resultados mas adelante expuestos, indican que estas ferredoxinas poseen 2 átomos de hierro por molécula, los pesos moleculares serán 12180 para la proteína de espinaca, y 13060 para la de lechuga.

Sobre la base de un contenido en leucina de 8 moléculas por mol de proteína se obtienen para las ferredoxinas de espinaca y lechuga pesos moleculares respectivos de 10870 y 11480 (ver Tablas XVI y XVII), una vez deducidas las correspondientes n-1 moléculas de agua de los enlaces peptídicos, y adicionados los 2 átomos de hierro y 2 equivalentes de azufre lábil por molécula. Estos valores son próximos a los obtenidos por las técnicas de centrifugación en gradiente y contenido en hierro, mas aún si se tiene en cuenta que en ellos no se ha considerado el contenido en triptófano -no determinado por nosotros-, y cuya presencia es constante en las ferredoxinas de plantas superiores.

En la Tabla XV se recogen los valores de pesos moleculares obtenidos usando las tres técnicas indicadas.

6.- Composición en aminoácidos.

Se han hecho por triplicado, en análisis alternantes de -

problemas y standards, las determinaciones de aminoácidos en los hidrolizados de 20 horas de ferredoxinas de espinaca y lechuga, cuantificándose cada problema frente al standard desarrollado - inmediatamente después. Al mismo tiempo se ha llevado a cabo un análisis, frente a su standard paralelo, de una muestra sometida a 70 horas de hidrólisis, cuantificándose en ella los aminoácidos treonina, serina y tirosina. La determinación de cada uno de ellos se efectuó de acuerdo con las indicaciones espuestas en Parte Experimental.

En las Figuras 30 y 31 se reproducen los aminogramas obtenidos con una muestra de hidrolizados de 20 horas de ferredoxinas de espinaca y lechuga, respectivamente. La altura de los picos es menor que esta última debido a la menor concentración de la solución partida.

Las Tablas XVI y XVII recogen los resultados de las distintas muestras analizadas. En ellas se incluye también la composición en aminoácidos de ambas ferredoxinas, normalizadas las concentraciones de los mismos a un contenido de 8 restos de leucina por molécula, y ajustados los valores así obtenidos al número mas próximo de unidades. Sobre esta base se calculó el peso molecular de las cadenas polipeptídicas y, finalmente, el peso de ambas ferredoxinas por adición de los valores correspondientes al hierro y azufre lábil.

7 y 8.- Contenido en hierro.- Determinación de azufre inorgánico como S^{2-} .

La determinación del contenido en hierro, efectuada por triplicado, dió como valores medios 0.99 y 0.86% para las ferredoxinas de espinaca y lechuga, respectivamente. Sobre la base de pesos moleculares 11810 y 12307, media de los obtenidos por los tres procedimientos arriba indicados, se calcu-

laron contenidos molares respectivos de hierro de 2.10 y 1.88, que claramente definen un valor de 2 átomos de hierro por molécula de ferredoxina.

Análogamente, hemos obtenido para el azufre como S^{2-} porcentajes en peso de 0.47 y 0.48% con las ferredoxinas de espinaca y lechuga, que en base a los pesos moleculares indicados representan contenidos molares de 1.75, para la ferredoxina de espinaca, y 1.85, para la de lechuga. Es obvio, por tanto, que ambas proteínas poseen dos restos S^{2-} por molécula.

En la Tabla XVIII se indican, pormenorizados, los valores obtenidos en una y otra determinación.

9.- Determinación de grupos -SH titulables.

En las figuras 32 y 33 se recogen las titulaciones respectivas con p-hidroximercuribenzoato de las ferredoxinas de espinaca y lechuga. El punto de equivalencia se ha obtenido por intersección de las rectas de regresión correspondientes a las lecturas de pendiente positiva, por un lado, y a las correspondientes a la meseta, por otro, siendo de $0.47 \mu M$ de PHMB -9.4 adiciones de 0.05 M cada una- para la ferredoxina de espinaca, y de $0.63 \mu M$ de PHMB -12.6 adiciones de 0.05 M- para la de lechuga.

El número total de equivalentes de mercurial admitidos por mol de ferredoxina se dedujo la cantidad de ésta sometida a titulación: 2 ml. de soluciones de ferredoxina de espinaca y lechuga con absorciones respectivas a 422 nm. de 0.31 y 0.35 que, sobre la base de coeficientes de extinción molar - 9.95×10^3 y 9.76×10^3 , representan $0.062 \mu M$ de ferredoxina de espinaca, y $0.072 \mu M$ de ferredoxina de lechuga.

$$\text{equiv. PHMB/mol ferredoxina de espinaca} = \frac{0.47}{0.062} = 7.6$$

$$\text{equiv. PHMB/mol ferredoxina de lechuga} = \frac{0.63}{0.072} = 8.7$$

10.- Accesibilidad de los grupos -SH por cromatografía de covalencia.

Las pruebas de accesibilidad de los restos -SH pusieron de manifiesto que, sin incubación previa con urea, las ferredoxinas de espinaca y lechuga eluyen cuantitativamente sin fijarse en la tiol-Sepharosa. Después de una incubación de 2 horas a 4° en presencia de urea 8M, la fijación fué prácticamente total; en tales condiciones las ferredoxinas aparecen desnaturalizadas, con pérdida de la absorción a 422 nm., no regenerándose la proteína nativa por diálisis.

Estos hechos indican una falta de accesibilidad de los grupos -SH de las ferredoxinas nativas al grupo activo piridínico, que cesa al romperse la estructura tridimensional de ambas proteínas por la acción del desnaturalizante.

III.- ESPECIFICIDAD BIOQUIMICA DE LAS FERREDOXINAS DE ESPINACA Y LECHUGA.

En la Tabla XIX se exponen los valores obtenidos para los tres sistemas enzimáticos de hojas de espinaca, ferredoxin-dependientes, ensayados frente a la ferredoxina homóloga de espinaca y la heteróloga de lechuga. Las determinaciones se efectuaron por triplicado, anotándose también los tantos por ciento de actividad de la ferredoxina de lechuga frente a la de espinaca.

TABLA VIII

Purificación de ferredoxina de hojas de espinaca

Material de partida: 3 kg de hojas brutas (suministrandó 1300 g de hojas despeciolladas y desnervadas).

	Volumen (ml)	Proteínas Lowry (mg)	A_{422}/A_{274}	Veces Purificado
Extracto crudo	1600	15520		1.0
Precipitación acetónica	167	1286		12.1
Adsorción DEAE-celulosa	35.5	230.7	0.20	67.3
Cromatografía DEAE-celulosa:				
fracción/es máxima actividad	30		0.46	
reunión fracciones activas	115	126.5	0.35	123
Filtración Sephadex G-75:				
fracción/es máxima actividad	20		0.49	
reunión fracciones activas	70	50.6	0.47	307
				(39.0 por pesada)

Rendimiento: 13 mg de ferredoxina/Kg de hoja bruta
 22 mg " " /Kg de hoja despeciollada
 y desnervada.

TABLA IX

Purificación de ferredoxina de hojas de lechuga

Material de partida: 8 Kg de hojas brutas (suministrando 1750 g de hojas verdes despecioladas y desnervadas).

	Volumen (ml)	Proteínas Lowry (mg)	A_{422}/A_{274}	Veces purificado
Extracto crudo	2300	20815		1.0
Precipitación acetónica	170	1287		16.2
Adsorción DEAE-celulosa.	40	356	0.17	58.5
Cromatografía DEAE-celulosa:				
fracción/es máxima actividad	30		0.33	
reunión fracciones activas	140	103.6	0.21	201
Filtración por Sephadex G-75:				
fracción/es máxima actividad	10		0.46	
reunión fracciones activas	43	40.8	0.44	510
				(31.9 por pesada)

Redimiento: 4 mg de ferredoxina/Kg de hoja bruta

18 mg " " /Kg de hoja despeciolada y desnervada.

TABLA X

Características espectros de las ferredoxinas de espinaca y lechuga

Espinaca:

Máximos de absorción	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Ox.} \\ \text{Red. rev.} \end{array} \right.$	460 nm.	422 nm.	330 nm.	274 nm.
		460 nm. (hombro)	422 nm. (hombro)	330 nm.	274 nm.
Razones de absorción (A-/A ₂₇₄)	Ox.	0.43	0.49	0.65	1.00
Razones de absorción	A _{ox.} /A _{red. rev.}	2.29	2.09	ND	ND
Absorción solución al 1%		ND	8.43	ND	17.47x10 ³
Coef. absorción M	Ox.	ND	9.95x10 ³	ND	20.63x10 ³

Lechuga:

Máximos de absorción	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Ox.} \\ \text{Red. rev.} \\ \text{Red. irrev.} \end{array} \right.$	460 nm.	422 nm.	330 nm.	274 nm.
		460 nm. (hombro)	422 nm. (hombro)	330 nm.	274 nm.
		-	-	330 nm.	274 nm.
Razones de absorción (A-/A ₂₇₄)	Ox.	0.41	0.46	0.66	1.00
Razones de absorción	$\left\{ \begin{array}{l} A_{\text{ox.}}/A_{\text{red. rev.}} \\ A_{\text{ox.}}/A_{\text{red. irrev.}} \end{array} \right.$	2.41	2.09	ND	ND
		7.50	5.71	ND	ND
Absorción solución al 1%		ND	7.93	ND	17.60x10 ³
Coef. absorción M	Ox.	ND	9.76x10 ³	ND	21.66x10 ³

TABLA XI

Elución de las columnas de electroenfoque para la determinación del punto isoeléctrico de las ferredoxinas de espinaca y lechuga

Fracción nº (0.4 ml)	Espinaca		Lechuga	
	pH	A ₄₂₂	pH	A ₄₂₂
2	3.85	-	3.72	-
3	3.93	-	3.80	-
4	4.15	0.55	4.10	0.57
5	4.33	0.58	4.56	0.60
6	4.97	0.51	5.29	0.46
7	6.04	-	6.44	-
8	6.90	-	7.20	-
9	7.47	-	7.69	-
10	7.80	-	8.00	-
11	7.98	-	8.20	-
12	8.20	-	8.41	-

TABLA XII

Absorción a 740 y 422 nm. y razón A_{740}/A_{422} , de una solución 0.1mM de metilviológico desde un estado de total reducción, pasando por reducciones parciales, hasta oxidación cuantitativa.

<u>A₇₄₀</u>	<u>A₄₂₂</u>	<u>A₇₄₀/A₄₂₂</u>
0.210	0.164	1.28 (100% red.)
0.183	0.147	1.24
0.159	0.125	1.27
0.133	0.107	1.24
0.109	0.086	1.26
0.083	0.066	1.25
0.038	0.030	1.26
0.015	0.012	1.25
0.0	0.0	- (100% ox.)
Valor medio:		1.25

TABLA XIII

Determinación de potencial redox de ferredoxina de espinaca (las letras entre paréntesis hacen referencia a

Parte Experimental)

$$A_{740}(\text{MV } 0.1\text{mM } 100\% \text{ red.}) = 0.210$$

$$A_{740}/A_{422} \text{ del MV red.} = 1.25$$

$$F = \frac{A_{422}(\text{Fd } 100\% \text{ ox.}) - A_{422}(\text{Fd } 100\% \text{ red.})}{A_{422}(\text{Fd } 100\% \text{ ox.})} = 0.514$$

$A_{422}(100\% \text{ Fd}_{\text{ox.}})$	A_{740} (en equil.)	$[\text{MV}_{\text{red.}}] = \frac{(d) \times 100}{0.210}$	$[\text{MV}_{\text{ox.}}] = 100 - [\text{MV}_{\text{red.}}]$	$A_{422} \text{ por MV} = \frac{(d)}{1.25}$	A_{422} (en equil.)	$A_{422} \text{ por Fd} = (f) - (e)$	$f = \frac{(c) - (g)}{(c)}$	$[\text{Fd}_{\text{red.}}] = \frac{100 \times f}{F}$	$[\text{Fd}_{\text{ox.}}] = 100 - [\text{Fd}_{\text{red.}}]$	$\frac{[\text{MV}_{\text{ox.}}][\text{Fd}_{\text{red.}}]}{[\text{MV}_{\text{red.}}][\text{Fd}_{\text{ox.}}]}$	E_o' (voltios)
(c)	(d)	(d)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(i)		
	0.149	70.95	29.05	0.119	0.635	0.516	0.469	90.04	9.96	3.701	-0.412
0.972	0.079	37.62	62.38	0.063	0.731	0.668	0.313	60.02	39.98	2.489	-0.423
	0.125	59.52	40.48	0.100	0.680	0.580	0.403	77.41	22.59	2.330	-0.424
0.956	0.036	17.14	82.86	0.029	0.792	0.763	0.202	38.75	61.25	3.058	-0.417

Valor medio = -0.419

TABLA XIV

Determinación de potencial redox de ferredoxina de lechuga (las letras entre paréntesis hacen referencia a Parte - Experimental)

$$A_{740}(\text{MV } 0.1\text{mM } 100\% \text{ red.}) = 0.210$$

$$A_{740}/A_{422} \text{ del MV}_{\text{red.}} = 1.25$$

$$F = \frac{A_{422}(\text{Fd } 100\% \text{ ox.}) - A_{422}(\text{Fd } 100\% \text{ red.})}{A_{422}(\text{Fd } 100\% \text{ ox.})} = 0.514$$

$A_{422}(100\% \text{ Fd}_{\text{ox.}})$	$A_{740}(\text{en equil.})$	$\left[\text{MV}_{\text{red.}} \right] = \frac{(d) \times 100}{0.210}$	$\left[\text{MV}_{\text{ox.}} \right] = 100 - \left[\text{MV}_{\text{red.}} \right]$	$A_{422} \text{ por MV} = \frac{(d)}{1.25}$	$A_{422}(\text{en equil.})$	$A_{422} \text{ por Fd} = (f) - (e)$	$f = \frac{(c) - (g)}{(c)}$	$\left[\text{Fd}_{\text{red.}} \right] = \frac{100 \times f}{F}$	$\left[\text{Fd}_{\text{ox.}} \right] = 100 - \left[\text{Fd}_{\text{red.}} \right]$	$\frac{\left[\text{MV}_{\text{ox.}} \right] \left[\text{Fd}_{\text{red.}} \right]}{\left[\text{MV}_{\text{red.}} \right] \left[\text{Fd}_{\text{ox.}} \right]}$	E_0 (voltios)
(c)	(d)	(d)	(d)	(e)	(f)	(g)	(h)	(i)	(i)		
0.963	0.150	71.43	28.57	0.120	0.643	0.523	0.457	88.89	11.11	3.203	-0.417
	0.138	65.71	34.29	0.110	0.660	0.550	0.429	83.42	16.58	2.627	-0.421
0.977	0.147	70.00	30.00	0.118	0.697	0.579	0.407	79.24	20.76	1.636	-0.433
	0.101	48.09	51.91	0.081	0.732	0.651	0.337	64.90	35.10	1.996	-0.428

Valor medio = -0.425

TABLA XV

Peso molecular de las ferredoxinas de espinaca y lechuga según técnica utilizada

<u>Técnica utilizada</u>	<u>Espinaca</u>	<u>Lechuga</u>
Centrifugación en gradiente	12380	12380
Contenido en hierro	12180	13060
Composición en aminoácidos	*10870	*11480
Valor medio	11810	12307

*No se considera el contenido en triptófano, no determinado.

TABLA XVI

Composición en aminoácidos y peso molecular de la ferredoxina de espinaca.

	20 horas hidrol. ($\mu\text{M/ml}$)				70 horas hidrol. ($\mu\text{M/ml}$)	Extrapolación tiempo 0 ($\mu\text{M/ml}$)	Normalización a 8 leucinas	Ajuste a número entero de restos
	M.1	M.2	M.3	Media				
Lisina	0.52	0.49	0.53	0.51		0.51	4.34	4
Histidina	0.13	0.15	0.13	0.14		0.14	1.19	1
Arginina	0.13	0.13	0.13	0.13		0.13	1.11	1
A.aspártico	1.78	1.71	1.72	1.74		1.74	14.81	15
Treonina	0.97	0.93	0.92	0.94	0.84	0.98	8.34	8
Serina	0.80	0.76	0.79	0.78	0.67	0.83	7.06	7
A.glutámico	1.68	1.58	1.60	1.62		1.62	13.79	14
Prolina	0.51	0.49	0.56	0.52		0.52	4.42	4
Glicocola	0.78	0.70	0.79	0.76		0.76	6.47	6
Alanina	1.12	0.87	1.03	1.01		1.01	8.60	9
Valina	0.91	0.79	0.74	0.81		0.81	6.89	7
Metionina	0.06	0.11	0.12	0.10		0.10	0.85	1
Isoleucina	0.51	0.47	0.43	0.47		0.47	4.42	4
Leucina	0.95	0.97	0.91	0.94		0.94	8.00	8
Tirosina	0.49	0.47	0.45	0.47	0.51	0.47	4.00	4
Fenilalanina	0.23	0.20	0.21	0.21		0.21	1.79	2
$\frac{1}{2}$ Cistina	0.44	0.44	0.47	0.45		0.45	3.83	4

Número total de restos: 99

p.m.cadena polipeptídica: 10690

p.m.ferredoxina ($2\text{Fe}-2\text{S}^{2-}$): 10870

TABLA XVII

Composición en aminoácidos y peso molecular de la ferredoxina de lechuga

	20 horas hidrol. ($\mu\text{M}/\text{ml}$)				70 horas hidrol. ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	Extrapolación tiempo 0 ($\mu\text{M}/\text{ml}$)	Normalización a 8 leucinas	Ajuste a número entero de restos
	M.1	M.2	M.3	Media				
Lisina	0.18	0.18	0.21	0.19		0.19	5.42	5
Histidina	0.07	0.08	0.07	0.07		0.07	2.00	2
Arginina	0.07	0.08	0.07	0.07		0.07	2.00	2
A. aspártico	0.47	0.47	0.52	0.49		0.49	14.00	14
Treonina	0.25	0.25	0.28	0.26	0.25	0.26	7.43	7
Serina	0.28	0.27	0.31	0.29	0.25	0.31	8.86	9
A. glutámico	0.46	0.47	0.52	0.48		0.48	13.71	14
Prolina	0.22	0.22	0.23	0.22		0.22	6.29	6
Glicocola	0.31	0.30	0.32	0.31		0.31	8.86	9
Alanina	0.23	0.19	0.25	0.22		0.22	6.29	6
Valina	0.29	0.28	0.27	0.28		0.28	8.00	8
Metionina	0.04	0.03	0.03	0.03		0.03	0.86	1
Isoleucina	0.13	0.15	0.16	0.15		0.15	4.29	4
Leucina	0.24	0.29	0.31	0.18		0.28	8.00	8
Tirosina	0.10	0.11	0.11	0.11	0.12	0.11	3.14	3
Fenilalanina	0.11	0.11	0.12	0.11		0.11	3.14	3
$\frac{1}{2}$ Cistina	0.14	0.13	0.14	0.14		0.14	4.00	4

Número total de restos: 105
 p.m. cadena polipeptídica: 11300
 p.m. ferredoxina ($2\text{Fe}-2\text{S}^{2-}$): 11480

TABLA XVIII

Determinación de Fe y S²⁻ en las ferredoxinas de espinaca y lechuga.

	<u>Espinaca</u>		<u>Lechuga</u>	
	<u>% en peso</u>	<u>moles/mol</u>	<u>% en peso</u>	<u>moles/mol</u>
Contenido en Fe	0.98	2.07	0.86	1.89
	1.01	2.13	0.85	1.87
	0.99	2.09	0.86	1.89
	M: 0.99	M: 2.10	M: 0.86	M: 1.88
Contenido en S ²⁻	0.48	1.77	0.48	1.85
	0.47	1.75	0.50	1.91
	0.46	1.74	0.47	1.80
	M: 0.47	M: 1.75	M: 0.48	M: 1.85

TABLA XIX

Operatividad de las ferredoxinas de espinaca y lechuga frente a varios sistemas enzimáticos ferredoxin-dependientes, de espinaca.

	<u>Espinaca</u>	<u>Lechuga</u>	<u>Lechuga/Espinaca</u> <u>%</u>
Nitrito reductasa (μ M de NO_2^- reducido/min./ml de sol. de ferredoxina)	0.59	0.36	
	0.57	0.34	58
	0.61	0.33	
	media: 0.59	media: 0.34	
Fructosa-1,6-difosfatasa (μ M de P_i liberado/min./ml de sol. de ferredoxina)	12.2	8.23	
	10.9	8.88	78
	10.9	9.31	
	media: 11.3	media: 8.8	
Ferredoxin-NADP-reductasa (μ M de NADP reducido/min./mg de clorofila.	0.84	0.50	
	0.84	0.52	62
	0.86	0.56	
	media: 0.85	media: 0.53	

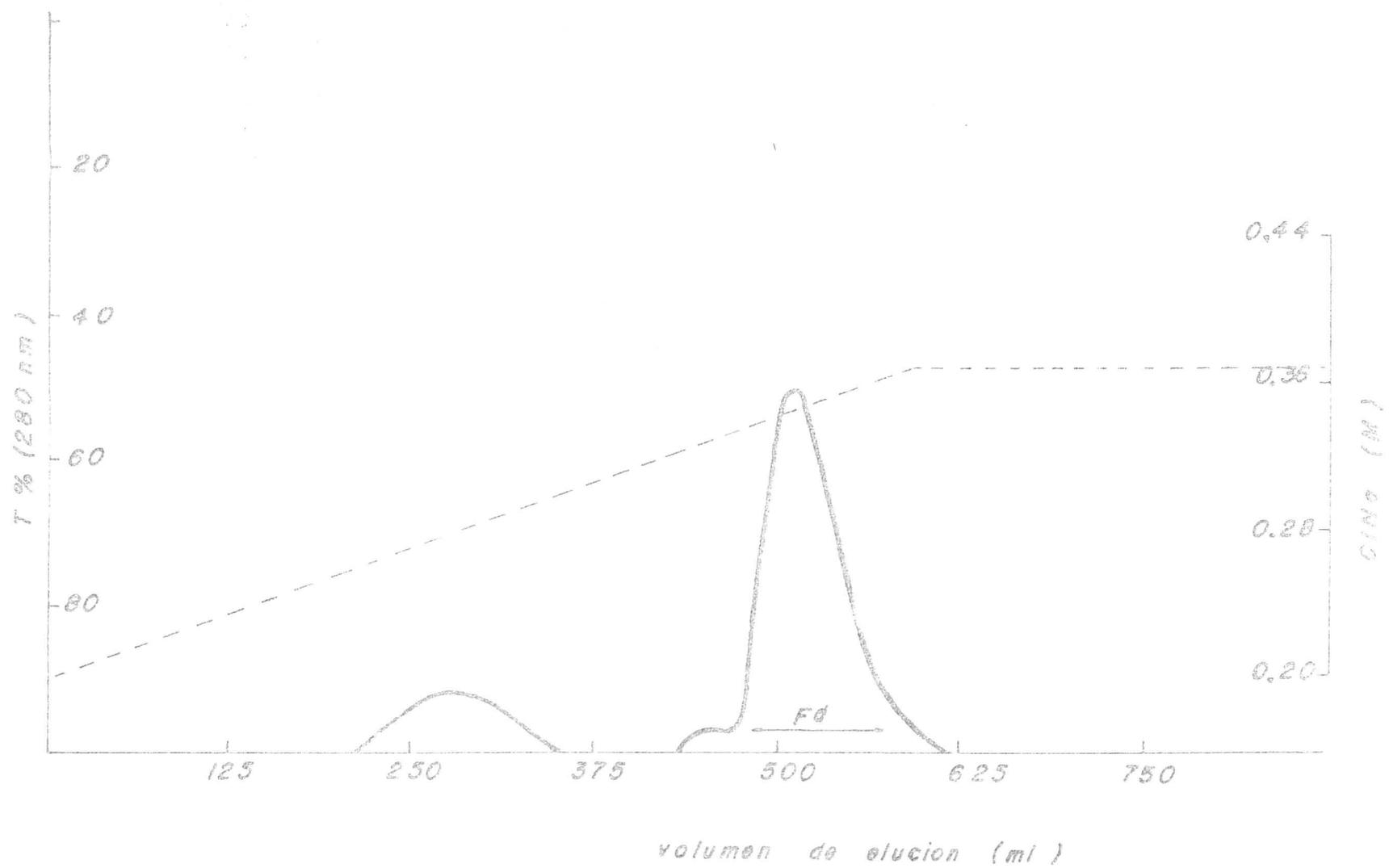


Fig 13

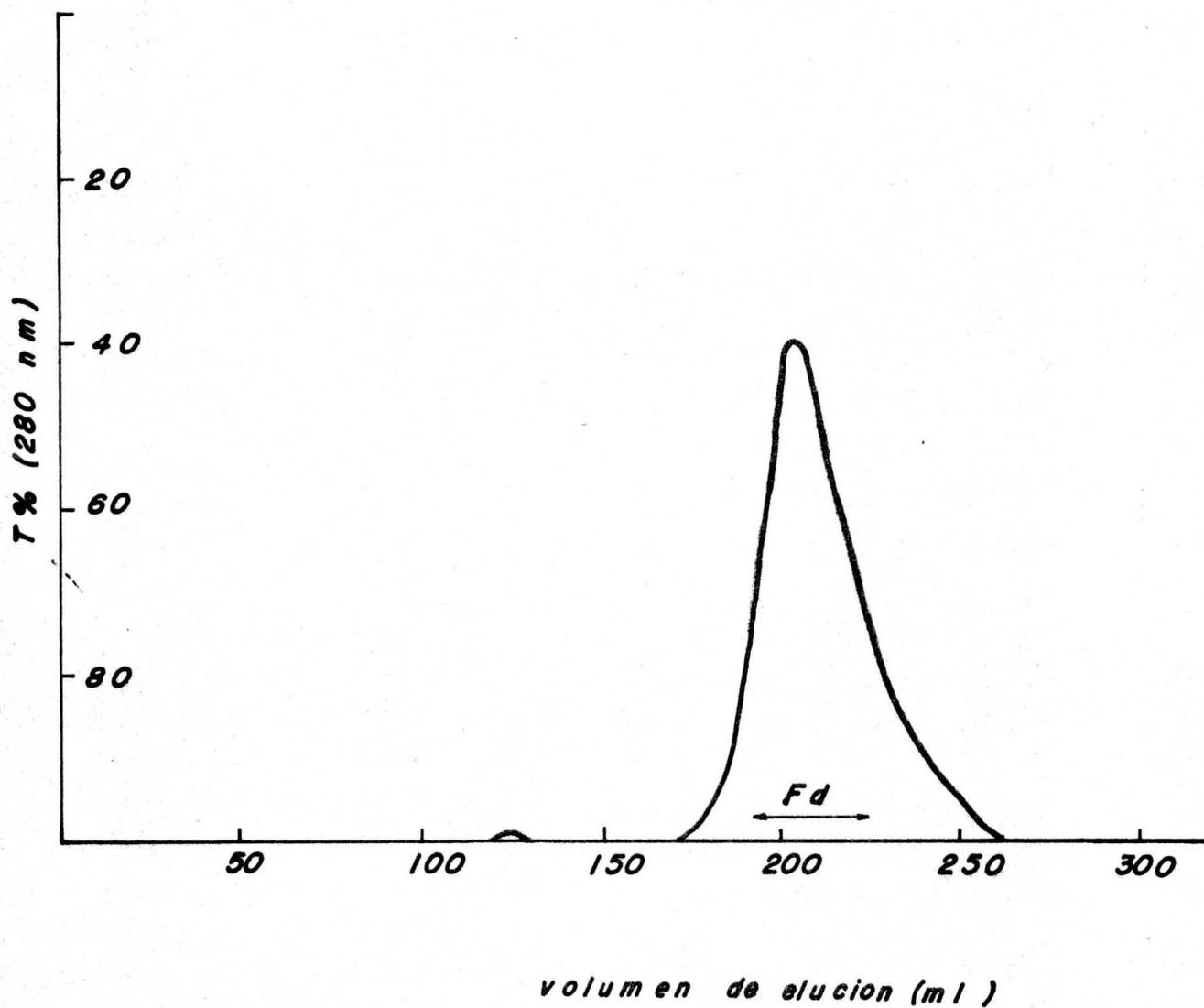


Fig 14

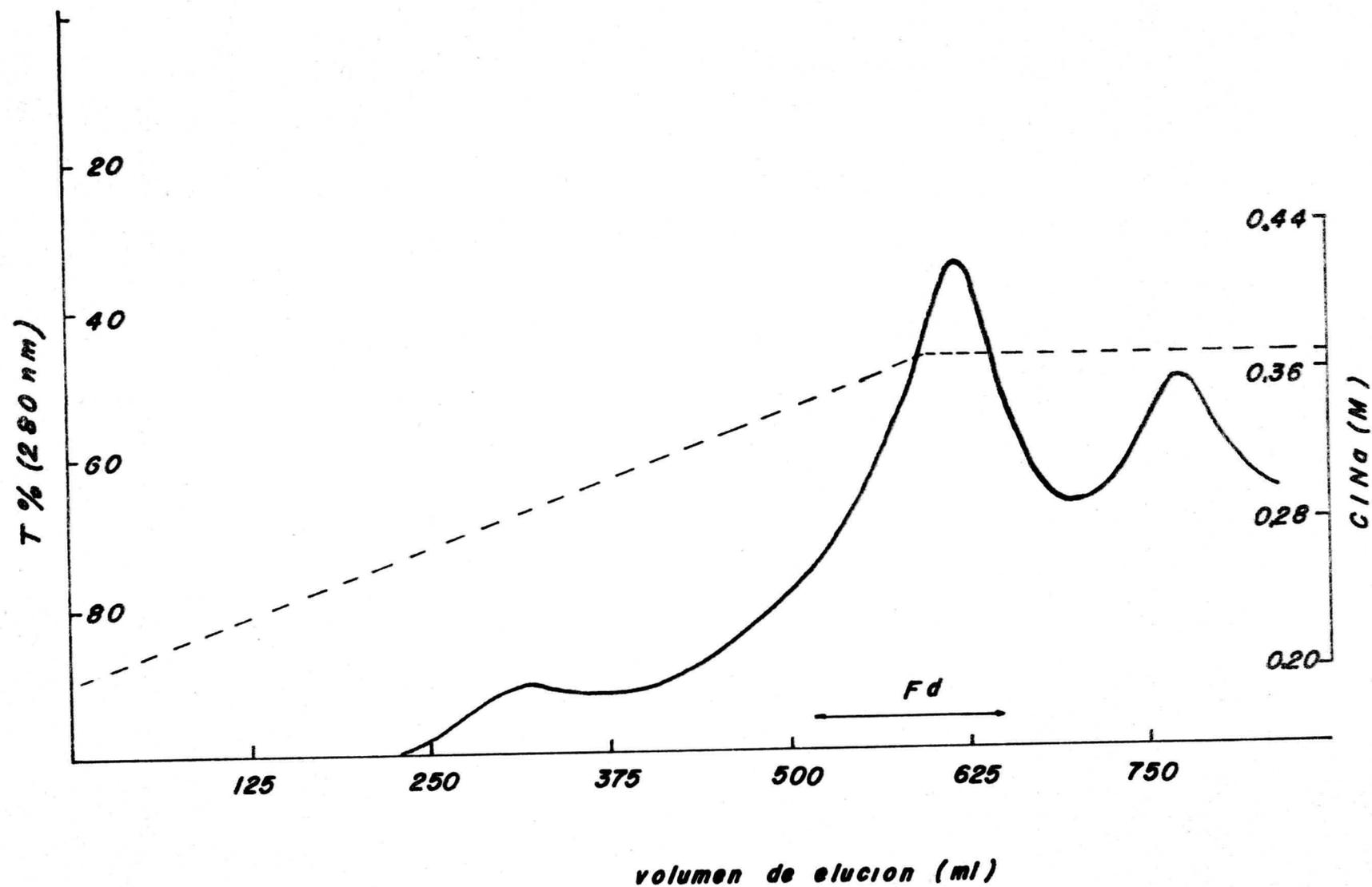


Fig. 15

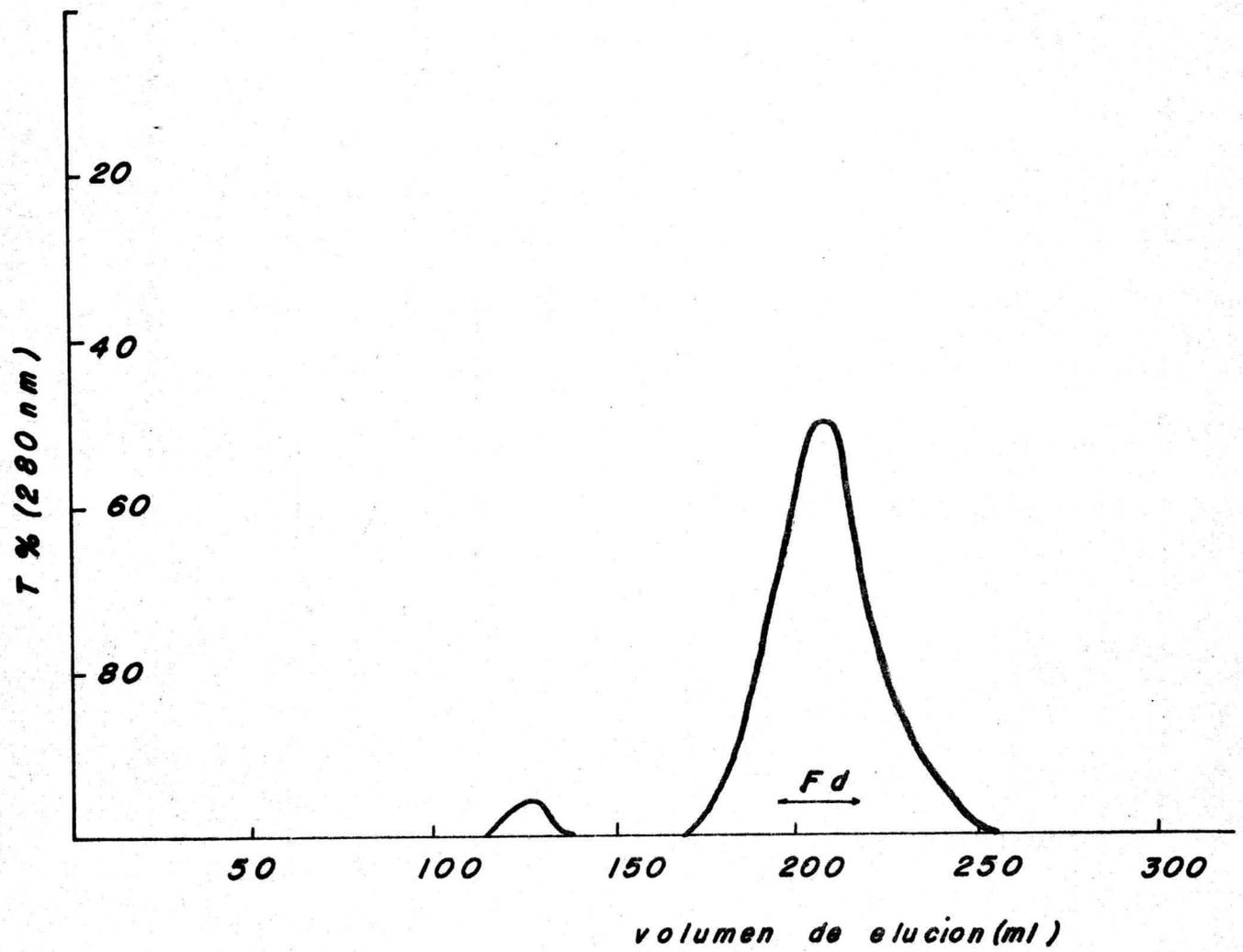


Fig 16

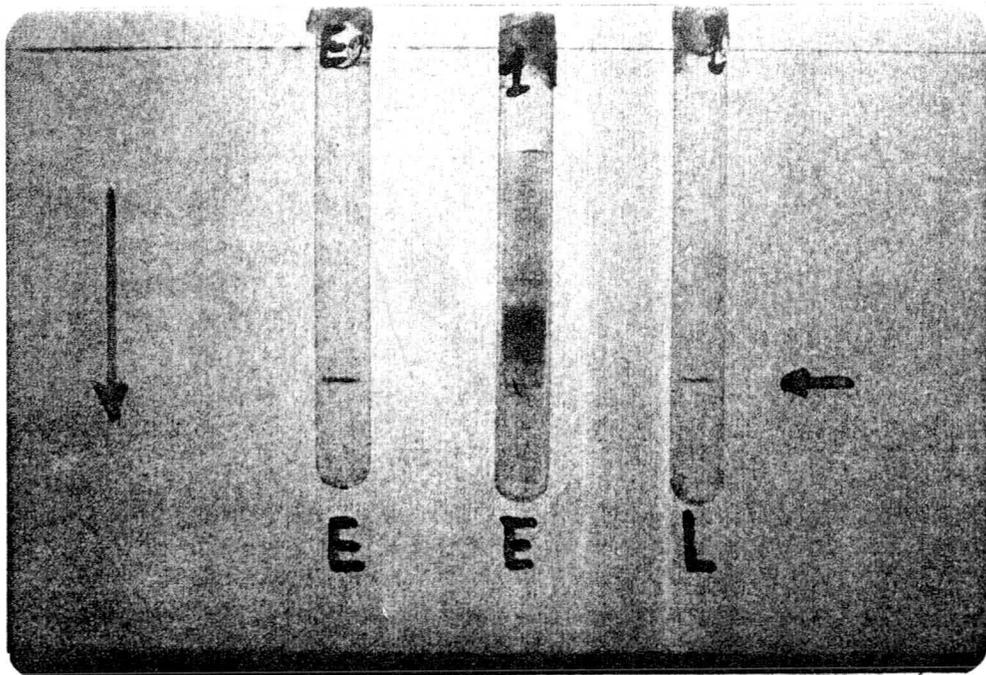


Fig. 17

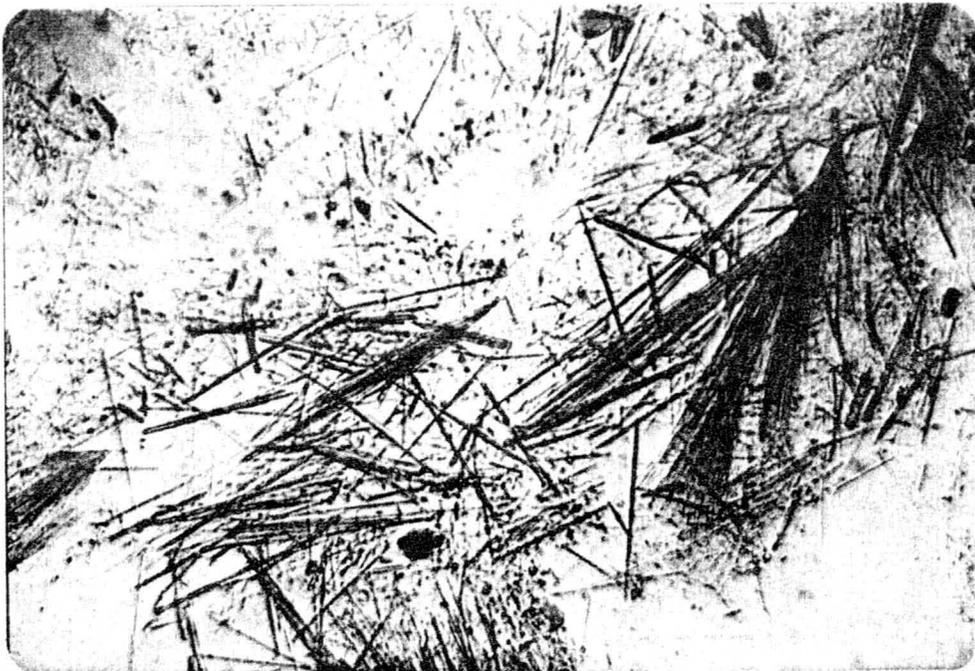


Fig. 18

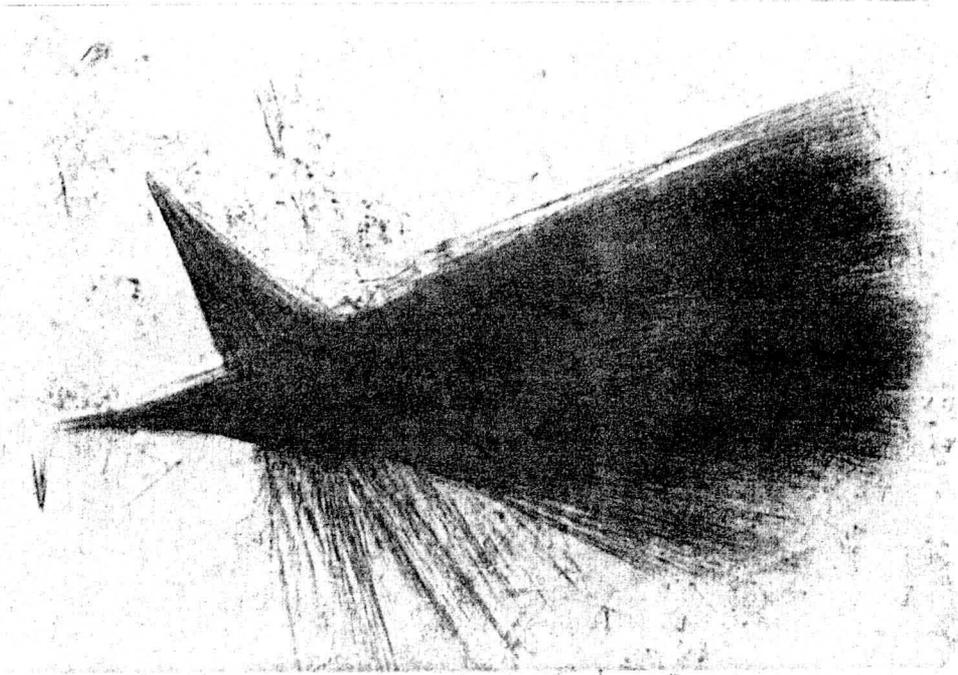


Fig. 19

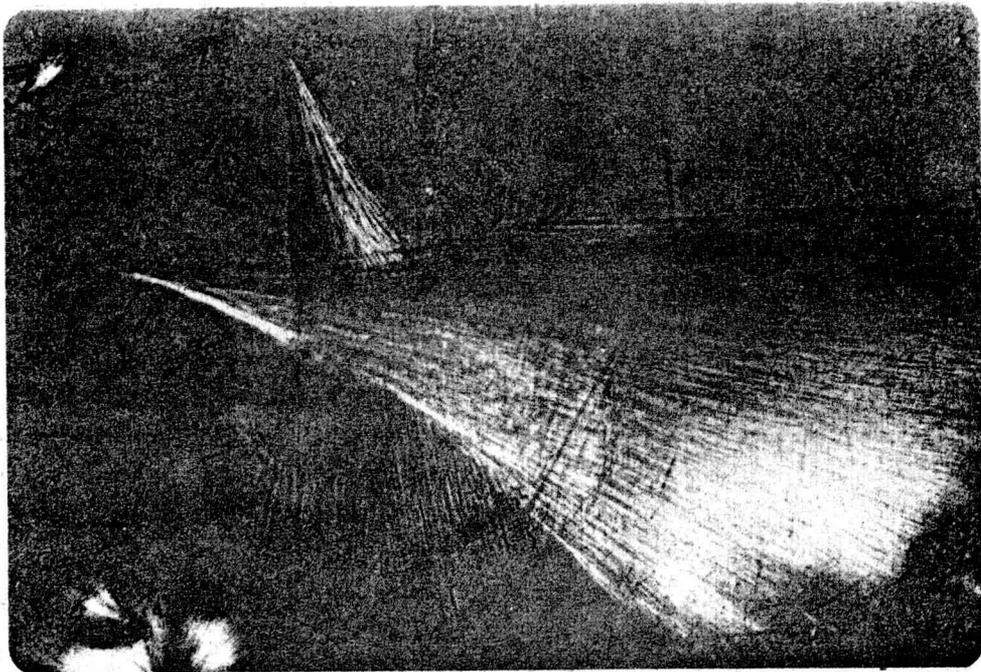


Fig. 20

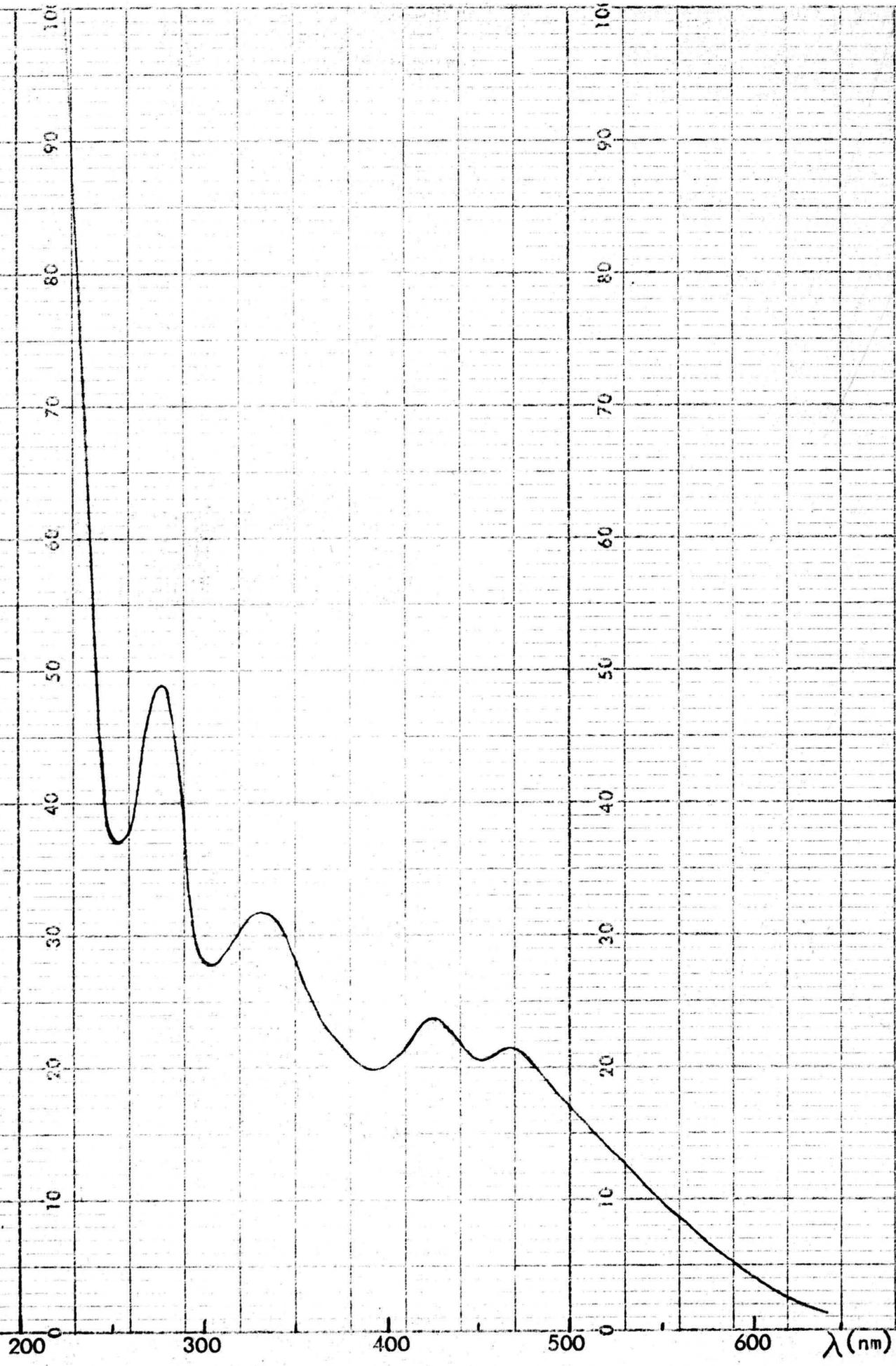


Fig. 21

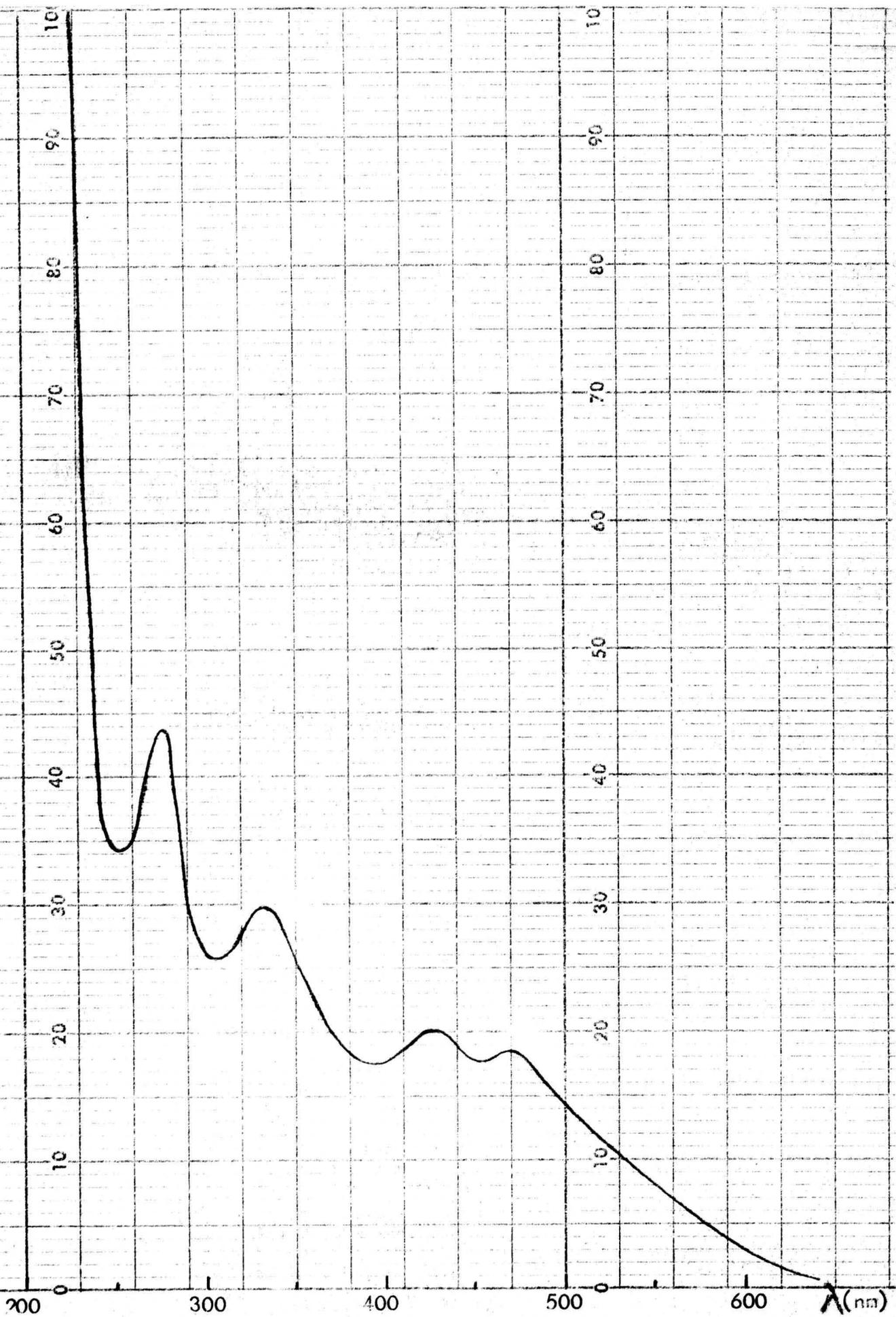


Fig. 22

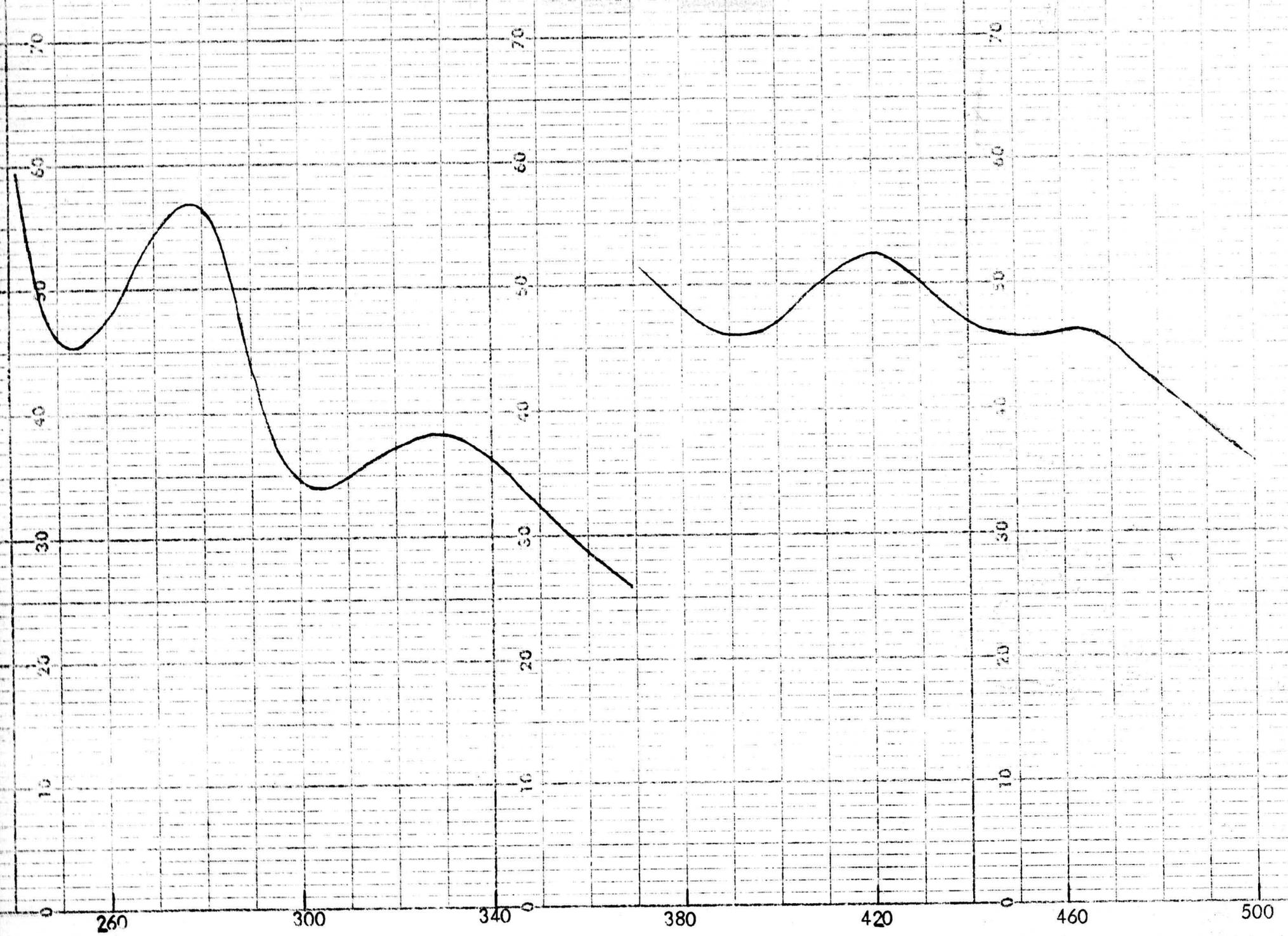


Fig. 23

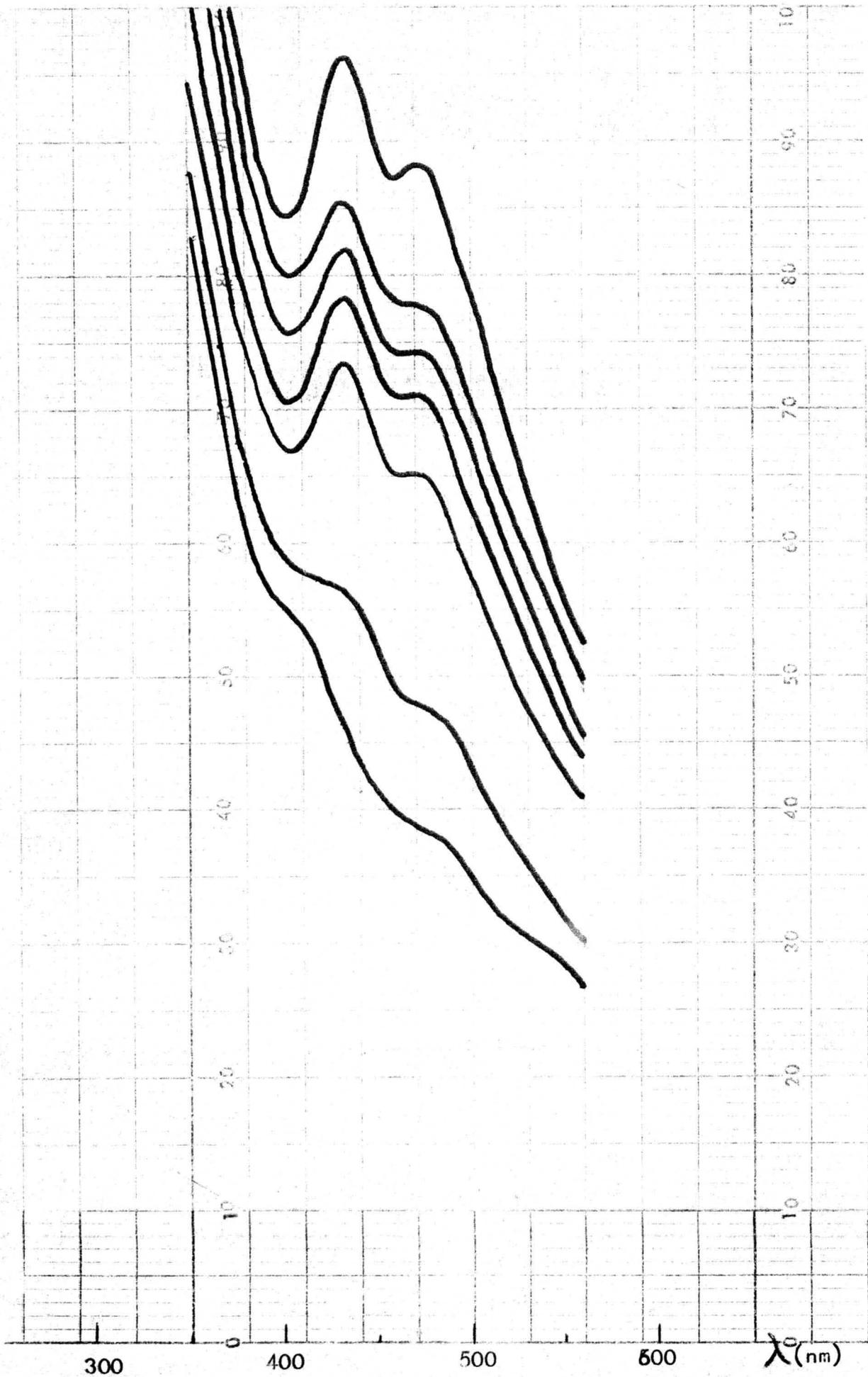


Fig. 24



Fig. 25

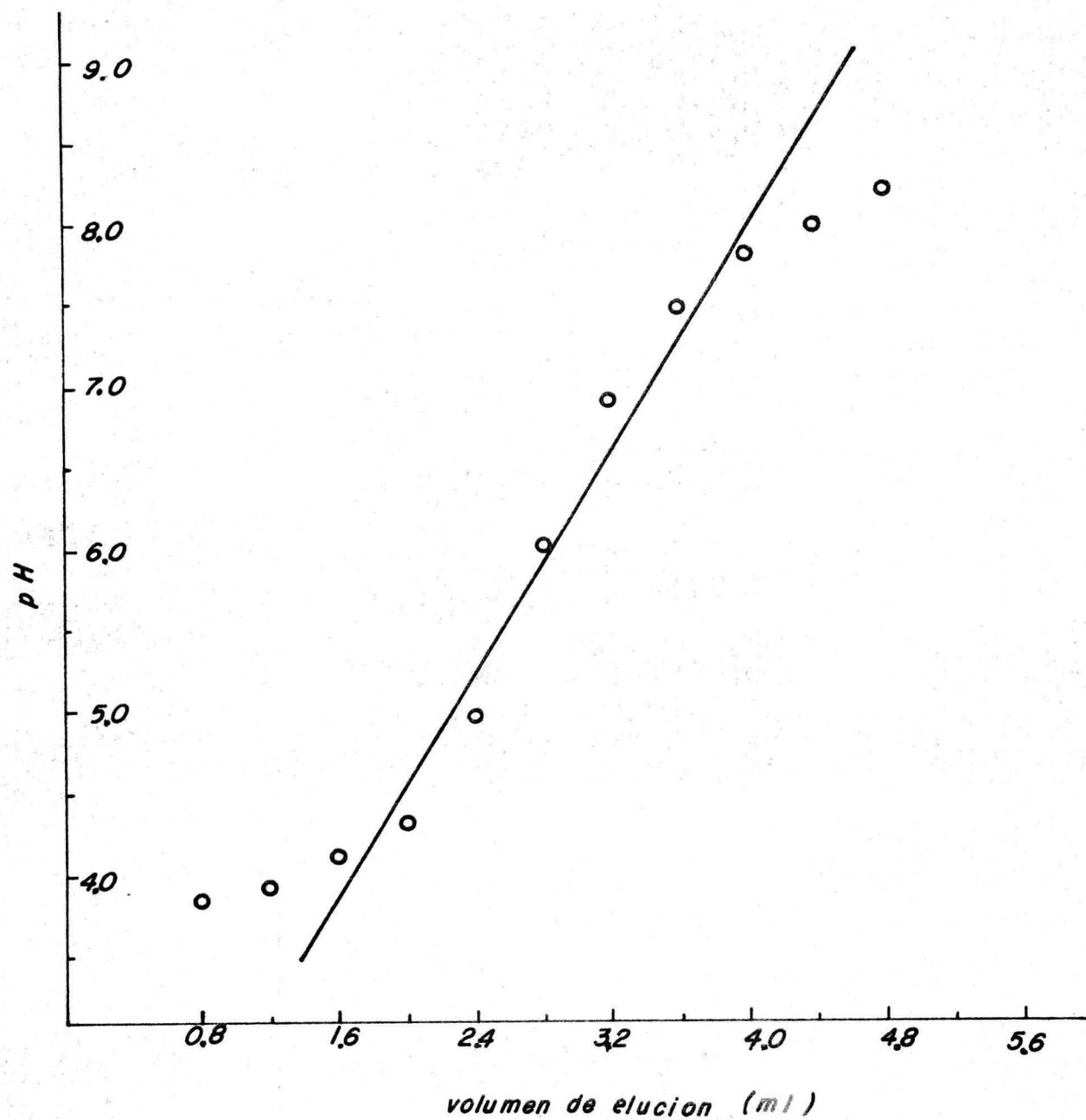


Fig.26

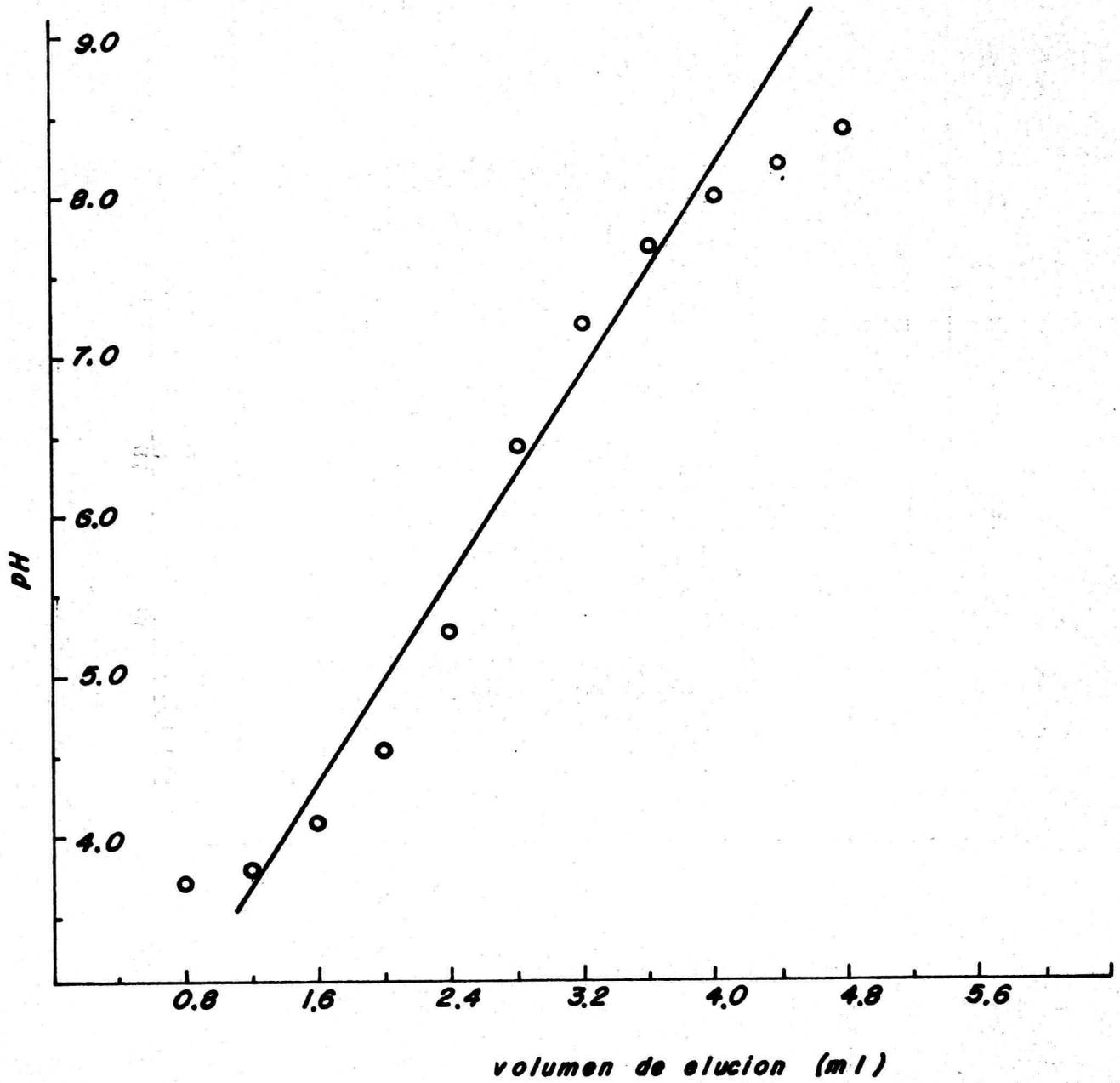


Fig- 27

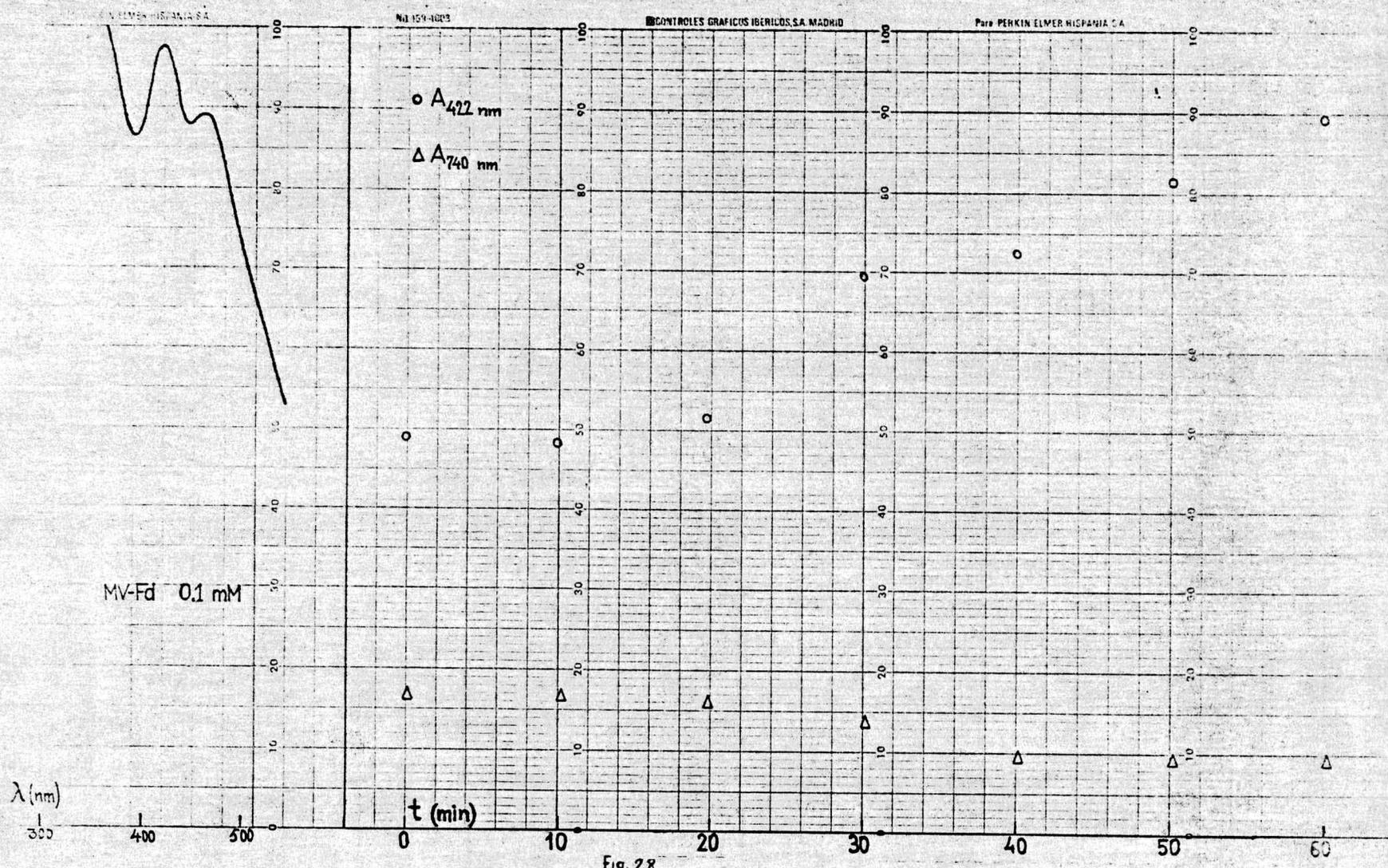


Fig. 28

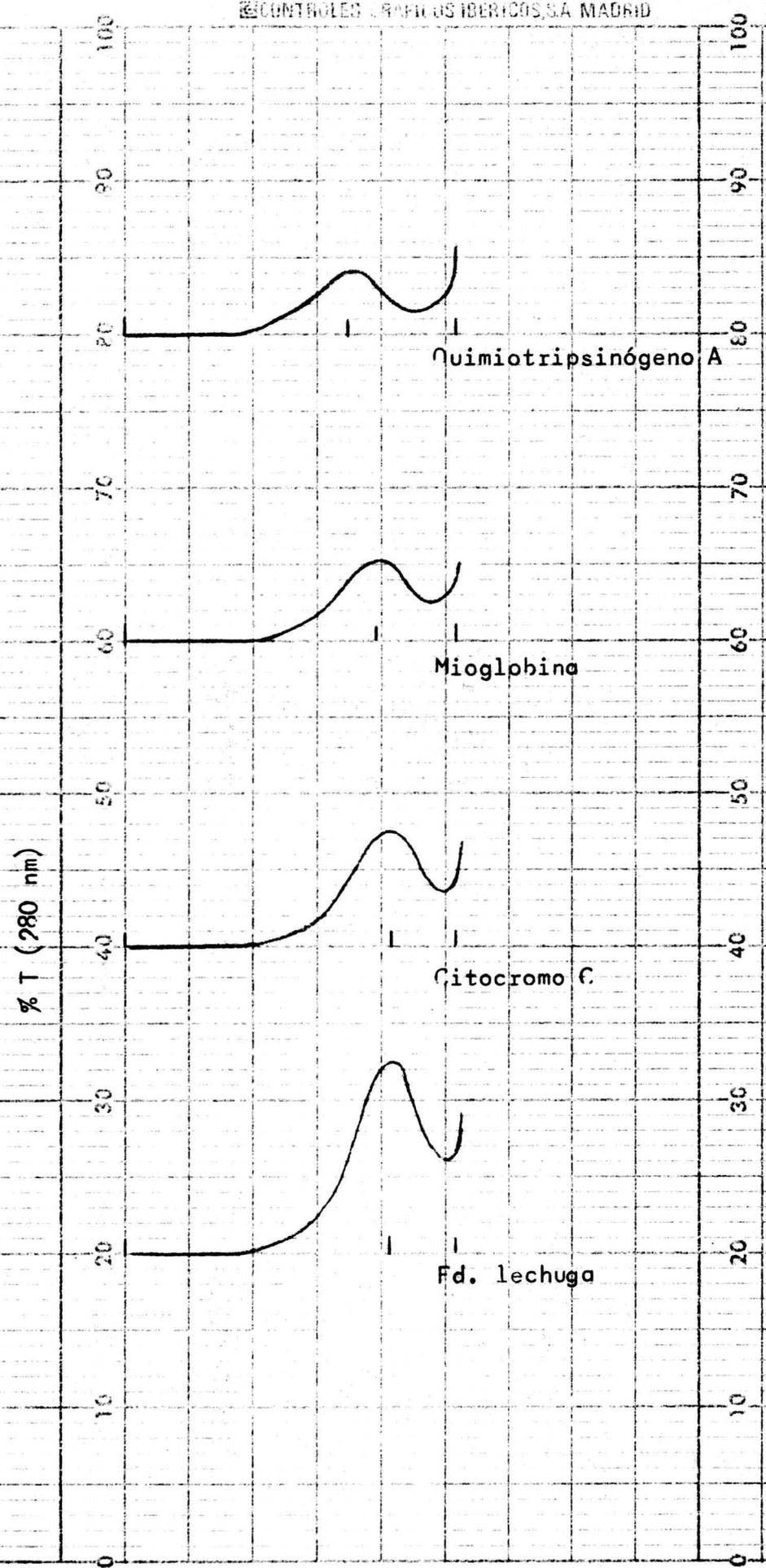


Fig. 29

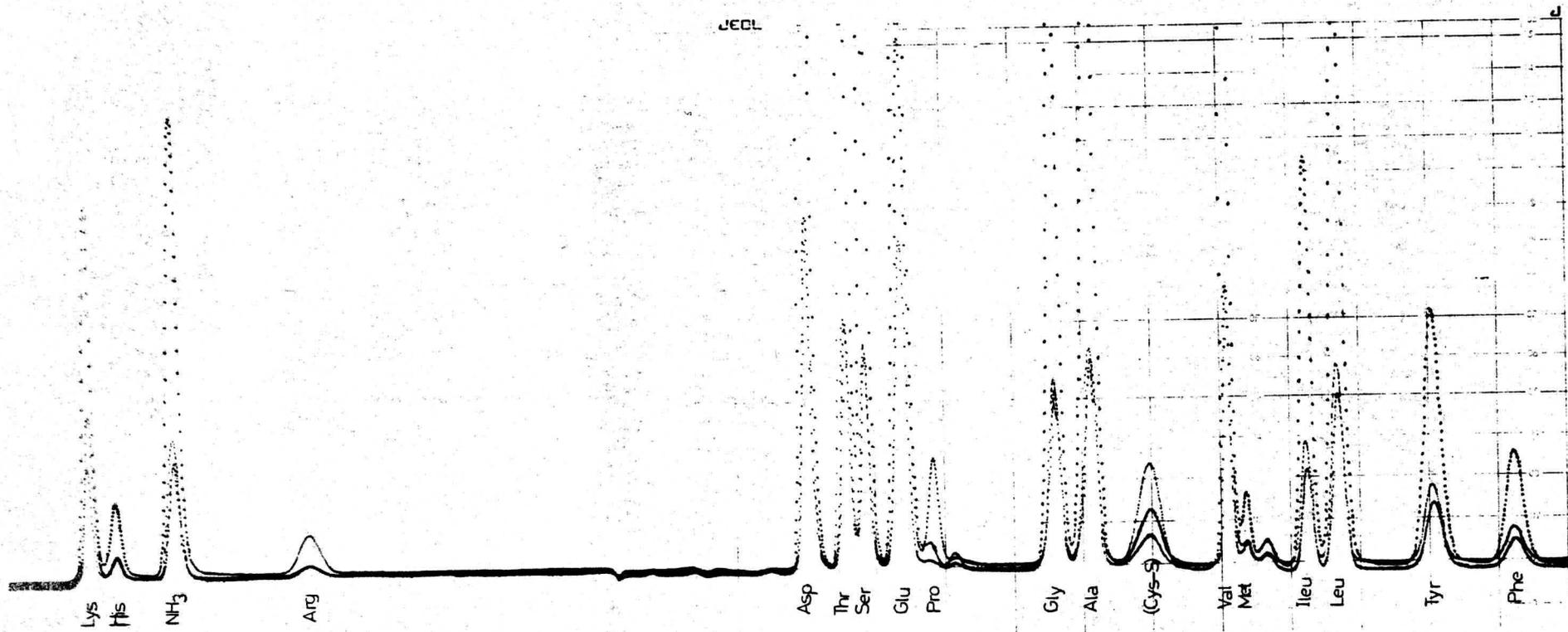


Fig.30

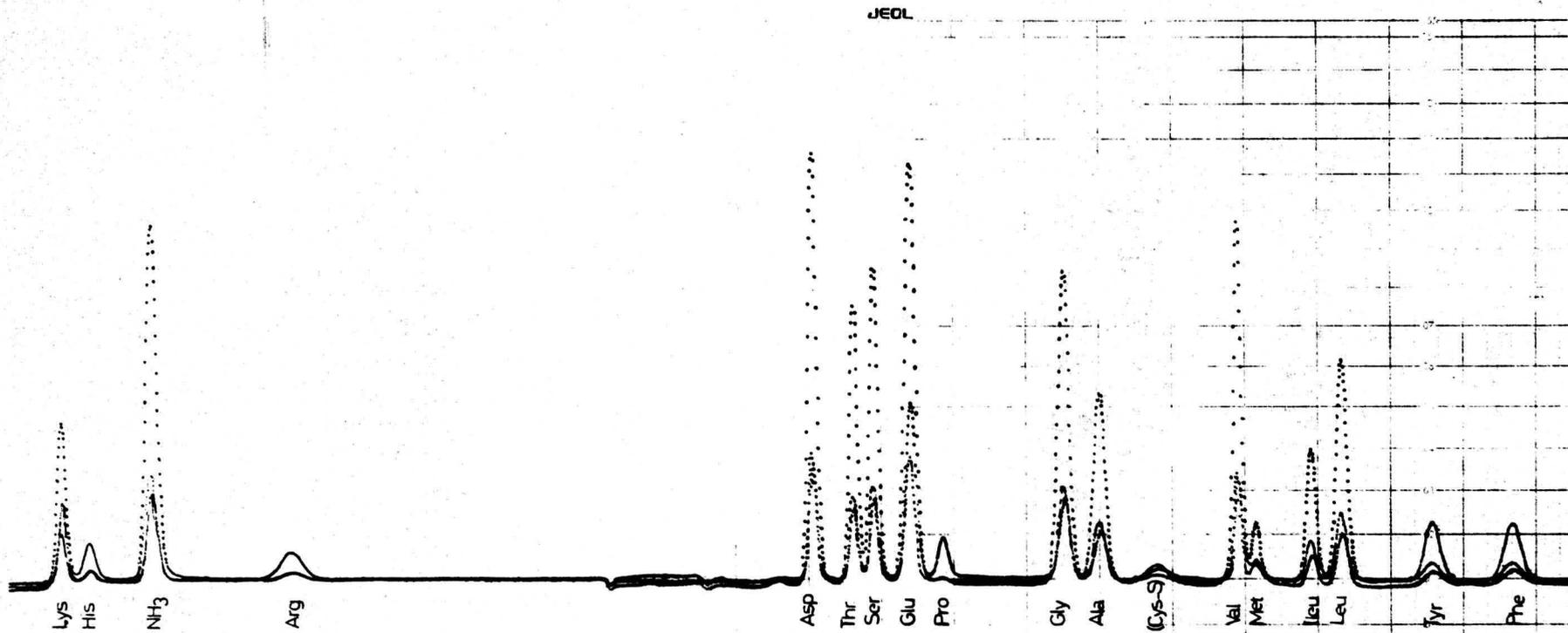


Fig. 31

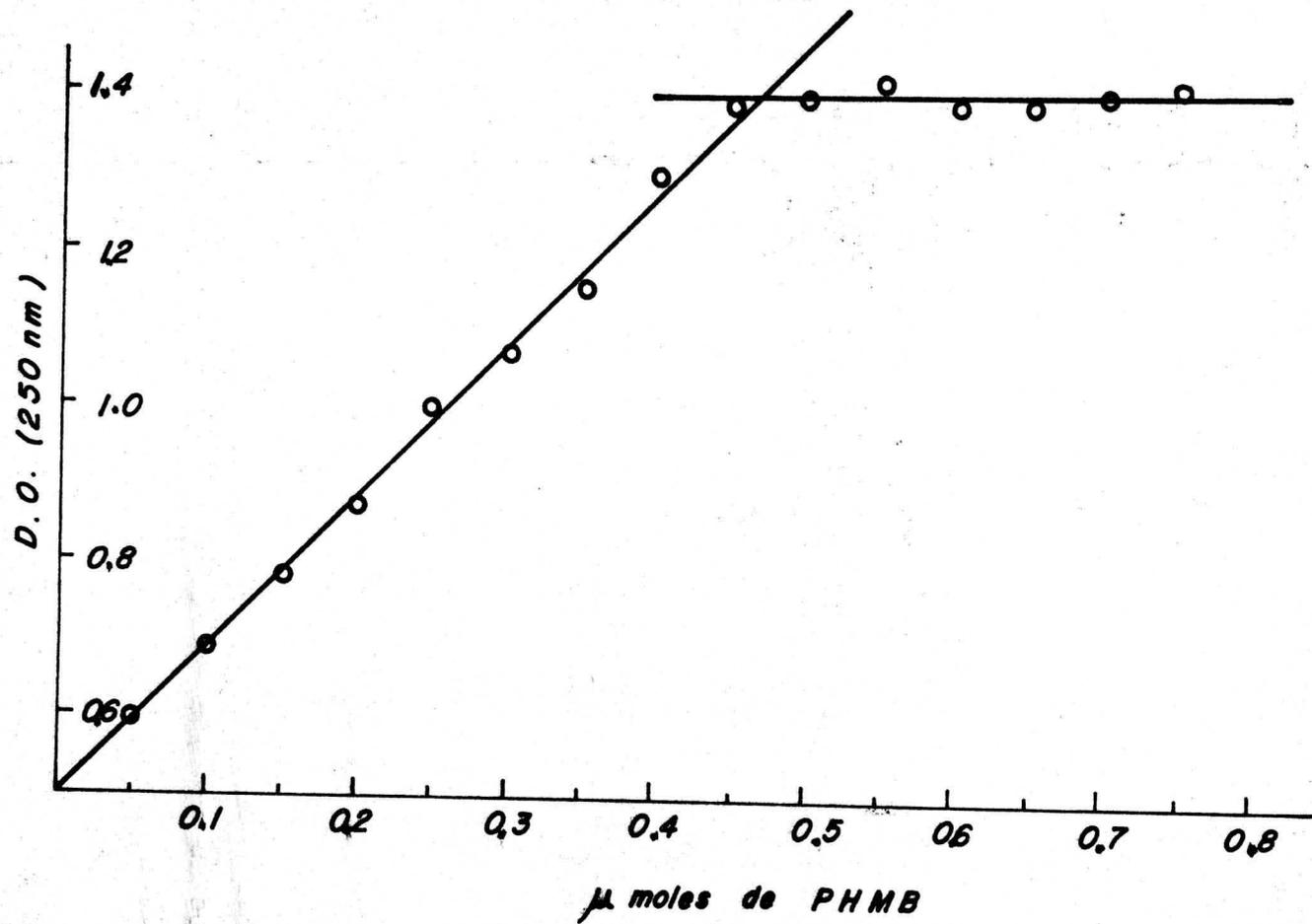


Fig. 32

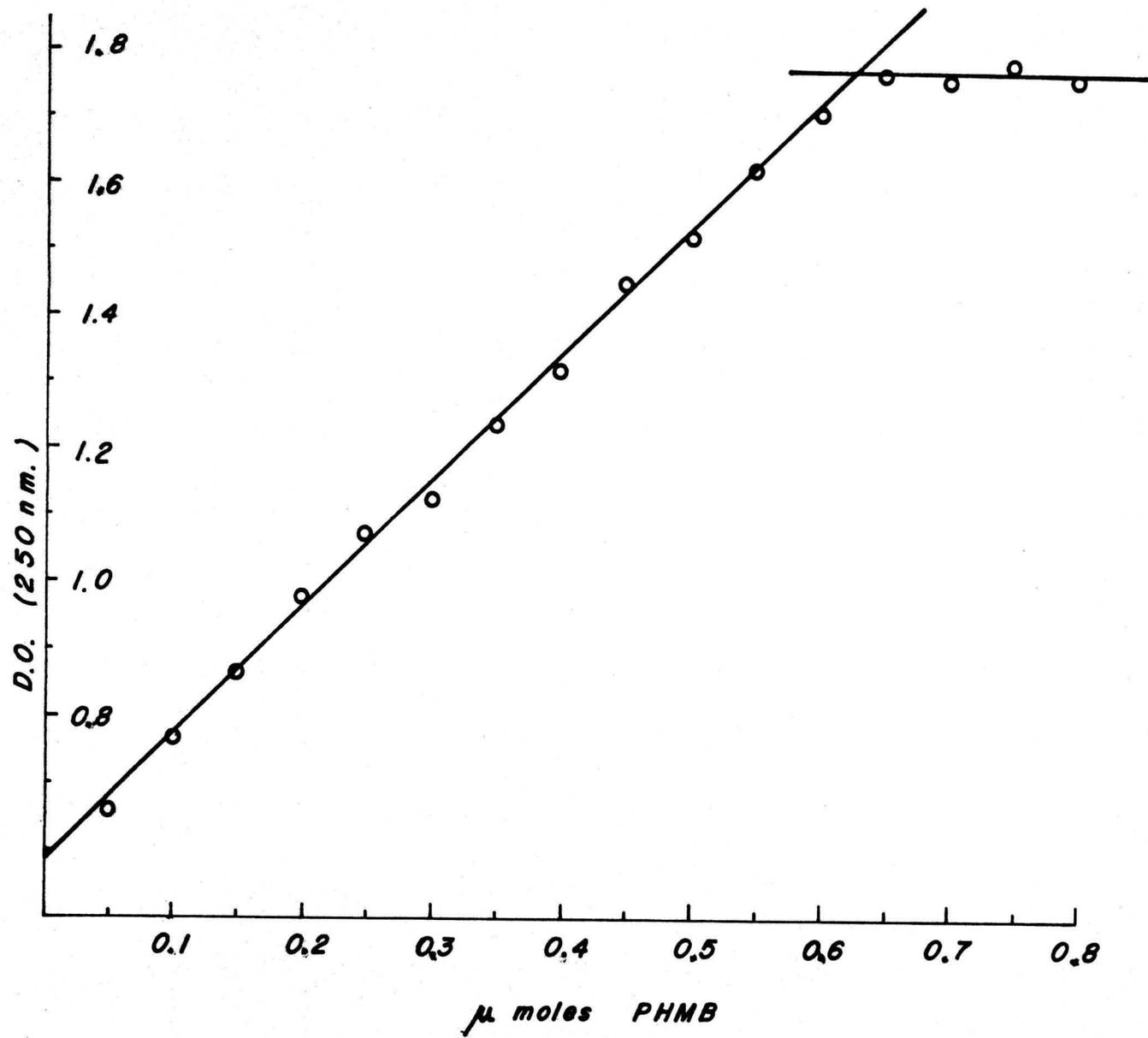


Fig. 33

DISCUSSION

Numerosas han sido las ferredoxinas purificadas hasta la fecha. Entre las bacterias no fotosintéticas se encuentran - las de *Azotobacter vinelandii* (86), *Clostridium pasterianum* - (87,89), *Cl. butyricum* (91), *Cl. acidi-urici* (91), *Cl. tetanomorphum* (91), *Cl. cylindrosporum* (91), *Cl. botulinum* (94), *Cl. thermosaccharolyticum* (92), *Cl. tartarivorum* (95), *Desulfovibrio gigas* (97), *Micrococcus aerogenes* (99), *Pseudomonas elsdenii* (100), *Peptococcus glycinophilus* (47) y *Bacillus polymyxa* (102) y las de *Chlorobium thiosulfatophilum* (19), *Chloropseudomonas ethylicum* (84), *Chromatium* (18) y *Rhodospirillum rubrum* (126), entre las bacterias fotosintéticas.

Ferredoxinas de algas han sido aisladas las de los - procariotes *Nostoc muscorum* (4), *Anacystis nidulans* (80), *Spirulina maxima* (180), *Microcystis* (82) y *Aphanotece* (83), y las de los eucariotes *Euglena gracillis* (104), *Chlamydomonas reinhardi* (104), *Scenedesmus* (105), *Bumilleriopsis filiformis* (107), *Porphyridium cruentum* (181) y *Botrydiopsis alpina* (181). Han - sido purificadas también las de los helechos *Equisetum* (122) y *Polystichum munitum* (119) y, finalmente, las de 11 especies Fa

nerógamas que se indican en la Tabla VI.

Salvo algunas excepciones, todas las ferredoxinas han sido purificadas siguiendo las pautas generales marcadas por Mortenson y col. (8, 87), Tagawa y Arnon (9) y Lovenberg y col. (91), basadas en el empleo de un número limitado de técnicas: precipitación acetónica, adsorción en DEAE-celulosa, fraccionamiento con sulfato amónico y filtración molecular por geles. Modificaciones en las condiciones de empleo de las mismas eran introducidas de acuerdo con las características del material de partida, y según se deseara aislar simultáneamente otros compuestos. Así, Mitsui (104) obtiene mediante tres tratamientos con DEAE-celulosa, filtración por Sephadex G-75 y precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, un preparado completamente puro de ferredoxina de Euglena, y otro de alto grado de pureza de citocromo C-552. Análogamente, Borchert y Wessels (153) obtienen por precipitación acetónica, fijación en DEAE-celulosa y doble filtración por Sephadex G-75, un preparado homogéneo de ferredoxina de espinaca, junto con una fracción a partir de la cual aislan ferredoxin-NADP-reductasa y plastocianina.

En general, todos los métodos hacen especial énfasis en el uso de DEAE-celulosa, ya que el alto contenido en aminoácidos ácidos de las ferredoxinas permite su fuerte fijación en este cambiador aún a pH ligeramente alcalino, y su posterior elución a pH constante por simple elevación de la concentración en Cl^- . Por otro lado, como la adsorción sobre DEAE-celulosa tiene también lugar en presencia de altas concentraciones de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y en medios fuertemente acetónicos, ello permite aplicar el cambiador después de eliminar proteínas extrañas por "salting out" con dicha sal (34, 87, 182), o después de extraer la ferredoxina del material de partida con acetona al 50%, tal como lo describen Crawford y Jensen (110) para la ferredoxina

de maiz.

Excepcionalmente se han utilizado otras técnicas para la resolución de casos concretos. Así, una cromatografía de adsorción en columna de hidroxapatito para el aislamiento de la ferredoxina de cola de caballo (122); o una doble electroforesis preparativa a pH 7.5 y 8.9 en gel de poliacrilamida para la purificación de la ferredoxina de Pinus pinea (120).

Un problema adicional es el de extracción del material biológico, en orden a la obtención de altos rendimientos en ferredoxina y a la prevención de la desnaturalización de ésta. Los sistemas buffer habitualmente usados para ello son a base de fosfatos o Tris-ClH, tamponados entre 7.2 y 8.0 para prevenir la pérdida de SH₂ que las ferredoxinas pueden sufrir aún en condiciones ligeramente ácidas (183). Y aunque estos compuestos se encuentran en estado soluble en el interior del cloroplasto, la adición de un detergente a la solución de extracción aumenta el rendimiento, seguramente por coadyuvar a la rotura de la pared del cloroplasto. Algunos detergentes tipo Tween 80 protegen a la ferredoxina del efecto inactivante de los taninos presentes en las hojas; ésto es especialmente patente en Ginnospermas -Pinus, Thuja, Taxus, etc. -, cuyos abundantes taninos destruyen totalmente la ferredoxina cuando se prescinde de él (123).

Especial énfasis ponen algunos autores en la necesidad de acortar en lo posible la duración del proceso de purificación, dada la labilidad del material a aislar. Teniendo en cuenta ésto Crawford y Jensen diseñaron un método para la ferredoxina de maiz que permite individualizarla en sólo 36 horas. Keresztes-Nagy y Margoliash purifican la ferredoxina de alfalfa (116) mediante un procedimiento que consideran óptimo por prescindir de pasos reputados como agresivos -uso de disolventes or

gánicos— o excesivamente lentos —centrifugación de grandes volúmenes, diálisis prolongadas, procedimientos electroforéticos, — etc. —, y que rápidamente desemboca en el manejo de pequeños volúmenes, sobre lo que es factible aplicar condiciones anaeróbicas de manipulación. En relación con esto último los autores — aconsejan desgasar las soluciones, y aún conservarlas bajo nitrógeno, cuando entre fase y fase del proceso de purificación haya de transcurrir cierto tiempo.

Un problema relacionado con la purificación es el control de ésta y la dosificación de la ferredoxina aislada. Métodos inespecíficos de cuantificación sólo podrán ser usados en el estadio final de total purificación. De ellos el de Lowry da sólo valores aproximados, pues con la ferredoxina de Colocasia (121) se obtienen, frente a un standard de albúmina bovina, — valores superiores en relación 4:3 a los obtenidos por pesada. Esta es, desde luego, el método más exacto, pero sometido a las limitaciones derivadas de las pequeñas cantidades que habitualmente se obtienen, y la inestabilidad e higroscopicidad de los preparados secos en presencia de aire, que obliga a efectuar la operación con suma diligencia.

Los métodos específicos, de los que el test de la ferredoxin-NADP-reductasa constituye la muestra más representativa, presentan también dificultades a nivel de preparados no purificados; Siedow y San Pietro (184) han hecho una enumeración de compuestos existentes en extractos de vegetales, que podrían competir con la ferredoxina como transportadores de electrones en la reducción del NADP y crotocromo C. Haslett y col. (185) propusieron un método basado en la medida por el electrodo de Clark del nivel de oxígeno desprendido, en presencia de cloroplastos lisados y lavados, como consecuencia de la reacción de Hill; la evidente falta de especificidad del método no requiere discusión.

Más recientemente, Matson y Kimura (186) han descrito un método inmunológico específico de dosificación de ferredoxina en extractos crudos, basado en la inhibición por un suero anti-ferredoxina de espinaca de la actividad ferredoxin-NADP-reductasa; es obvio, sin embargo, que el método estará sometido a las mismas limitaciones anteriormente indicadas para dicho test.

Nosotros hemos adoptado el método de Lowry para seguir, a efectos comparativos, el control del proceso de purificación a lo largo de los pasos del mismo. No obstante, para el cómputo del rendimiento en ferredoxina, hemos determinado por pesada el preparado homogéneo final seco, deduciendo del mismo peso de buffer Tris-ClH correspondiente al volumen último desecado. Esto nos permitió, previa disolución del material seco en un volumen fijo, calcular posteriormente el coeficiente de absorción de las ferredoxinas a las longitudes de onda adecuadas, valor que se usó posteriormente para la cuantificación del material de partida en las determinaciones subsiguientes.

El test de la ferredoxin-NADP-reductasa lo hemos utilizado como criterio de funcionalidad, mientras que la razón de absorciones visible/UV y la electroforesis en acrilamida, como pruebas de pureza y homogeneidad. Las altas movilidades en acrilamida, derivadas del bajo peso molecular de estos compuestos, provocan desplazamientos de las ferredoxinas con el frente a las concentraciones habituales de gel, impidiendo un control correcto de la homogeneidad de la proteína. Esto nos ha forzado, con los inconvenientes metodológicos que presenta, a usar geles del 15% de acrilamida, concentración análoga a la usada por Zanobini y col. (120) para la ferredoxina de Pinus pinea, y aún inferior al 30% empleado por Rao (121) con la procedente de Colocasia, que presenta así un 75% de movilidad respecto al frente.

La metódica de purificación que hemos usado se basa en las técnicas generales antes indicadas y presenta sobre el método desarrollado por Tagawa y Chain (41) la particularidad de efectuar el desarrollo cromatográfico en DEAE-celulosa mediante gradiente continuo de ClNa , en vez de discontinuo de la técnica original, y de introducir como final del proceso una filtración molecular por Sephadex G-75, no existente en aquella. Todos los pasos han sido análogos en espinaca y lechuga, si exceptuamos una columna de DEAE-celulosa de 40 cm. para la segunda, frente a la de 30 cm. de la primera; esta longitud adicional fué introducida para conseguir una mejor resolución frente a una zona de impurezas, no existente en espinaca.

Según se deduce en las Tablas VIII y IX, hemos conseguido rendimientos en ferredoxinas del orden de 13 mgs. y 4 mgs. por Kg. de hoja bruta, no despeciada y desnervada, de espinaca y lechuga, respectivamente, calculados sobre el material purificado seco determinado por pesada. Estos rendimientos pasan a ser del orden de 22 mgs. y 18 mgs./Kg. cuando se refieren a hojas desprovistas de peciolas y nerviaciones prominentes supuesta la no utilización de las hojas anteriores, de los cogollos de las lechugas de mercado. Destaca la fuerte diferencia de rendimiento en lechuga, según se refiera a uno u otro tipo de hoja partida, cosa explicable teniendo en cuenta la densa y fuerte nerviación de esta especie en comparación con la espinaca, que hace que 8 Kg. de material foliar bruto se reduzcan a 1.75 Kg. de hoja desnervada.

Estos rendimientos son del mismo orden que los 17.5 20 mgs/20 mgs/Kg. obtenidos en espinaca por Borchert y Wessels (153), y a los 20 mgs/Kg. del método original de Tagawa y Chain (41) para esta misma especie. Valores análogos de 20-25mgs/Kg. han sido datos por Keresztes-Nagy y Margoliash (116) para la ferredoxina de alfalfa, y de 25 mgs./Kg. por Rao (121) para la de -

Colocasia esculenta. Por el contrario, rendimientos sólo de 2.5 mgs./kg. han sido encontrados en la purificación de ferredoxina de Equisetum (122), y aún de 0.33 mgs./kg. para la de Pinus pinea (120).

Rendimientos sensiblemente superiores, de 37.5 mgs./kg., han sido obtenidos para la ferredoxina de maíz (110), confirmando así los hallazgos de algunos investigadores de que los vegetales tipo C_4 poseen alrededor del 50% más de ferredoxina (125) y componentes P-700 (187), en base al contenido en clorofila, que los de tipo C_3 . La explicación a este hecho ha sido buscada en el sentido de que los vegetales de alto rendimiento fotosintético poseen una fotofosforilación cíclica más activa, a fin de compensar el mayor gasto de ATP que implica la fijación de CO_2 según el ciclo de Hatch-Slack. No obstante, y desde un punto de vista cualitativo, no se han observado diferencias ostentables entre las ferredoxinas de juncia (125), maíz (110) y amaranto (119), todos ellos vegetales tipo C_4 , en relación con las de tipo C_3 .

La cristalización de ferredoxinas se ha hecho habitualmente por el simple método de adición de $SO_4(NH_4)_2$ sólido a una solución de la proteína, hasta alcanzar concentraciones que oscilan entre el 62% de saturación, para las ferredoxinas de Azobacter (86), y el 90% o aún más, para la de espinaca (41); una cristalización lenta a 4° ayuda a obtener cristales grandes. Una excepción a este método, y no muy comprensible dada la reconocida inestabilidad de estos compuestos a pH ácido, es la cristalización de la ferredoxina de perejil descrita por Hill y Bendall (112), conseguida acidificando con acético una solución de la misma en sulfato amónico de saturación media. Nosotros hemos adoptado el procedimiento de Zeppezauer y col. (160), en que una concentración al 95% de saturación con

$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ se consigue paulatinamente mediante microdiálisis - frente a la misma de una solución concentrada de ferredoxina - mantenida en un saco de celofán.

Hemos conseguido así para la ferredoxina de lechuga los espléndidos cristales mostrados en la Fig. 17, con tendencia a agruparse en los haces escobiformes de las Figuras 18 y 19. Por el contrario, con la ferredoxina de espinaca no hemos ido más allá de obtener un polvo microcristalino, del tipo obtenido por Tagawa y Arnon (188) para esta misma ferredoxina. Con la procedente de perejil, la otra ferredoxina de Fanerógamas hasta el presente cristalizada, la cristalización es también muy precaria, bajo forma de pequeñas esferas erizadas (112).

Esto contrasta con los magníficos resultados obtenidos con la proteína de las algas *Nostoc* (4) y *Scenedesmus* (105); espléndidos cristales en forma de agujas y barras, respectivamente, se han conseguido con las ferredoxinas de *Euglena gracilis* y *Chlamydomonas* (104). Siguiendo a la primera ferredoxina bacteriana cristalizada la de *Cl. pasterianum* por Lovenberg y Sobel (34), un amplio espectro de ferredoxinas clostridiana lo han sido por Lovenberg y col. (91), sorprendentemente con formas muy diversas dada la indudable afinidad de origen de todas ellas: la de *Cl. pasterianum* en placas, las de *Cl. butyricum* y *Cl. cylindrosporum* en racimos, la de *Cl. tetanomorphum* en rosetas, y la de *Cl. acidurici* en agujas, siendo esta última la que cristaliza mejor, más rápidamente, y a las más bajas concentraciones de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

La ferredoxina de la bacteria púrpura azufrada *Chromatium* ha sido cristalizada en forma de barras por Bachofen y Arnon (18). Finalmente, de todas las ferredoxinas hasta ahora obtenidas al estado cristalino, constituye la ferredoxina I de

Azobacter vinelandii (86) la que lo hace en cristales de mayor tamaño, en forma de amplias placas de hasta 1 mm. de longitud.

Un problema crítico en relación con las ferredoxinas es el de su estabilidad y conservación. Ambas hay que analizarlas en función de la atmósfera en que se encuentran, de la temperatura, y del pH, naturaleza y fuerza iónica del sistema buffer del medio. Ya durante las primeras purificaciones de ferredoxinas clostridianas Lovenberg y col. (91) observaron diferencias significativas en su estabilidad, experimentando algunas de ellas un deterioro evidente al cabo de algunas horas después de purificadas. La primera discusión bien documentada sobre este tipo de inactivación ha sido presentada por Keresztes-Nagy y Margoliash (116) en relación con la ferredoxina de alfalfa, en la que se observaron un 50% de deterioro al cabo de 2 horas de permanencia al aire a una temperatura de 48°, pasando a ser el total después de 12 horas. A una temperatura de 65° el deterioro es cuantitativo ya a los 15-20 min., mientras que si las soluciones se desgasan y conservan bajo nitrógeno son capaces de mantenerse inalteradas a dicha temperatura durante bastantes horas; finalmente, bajo nitrógeno y a -15° la conservación es prácticamente indefinida.

Análogamente, la ferredoxina I de *Azotobacter* permanece inalterada durante 5 meses conservada a -20° bajo argón, tanto en forma cristalina como en solución tamponada, mientras que a esa temperatura y en presencia de aire se deteriora parcialmente en menos tiempo (86). Lo mismo le ocurre a la ferredoxina de *Colocasia*, que se conserva bien a -15° bajo hidrógeno, sufriendo un parcial blanqueamiento al aire a 4° (121). Este deterioro va acompañado de pérdida de color, lo que se debe a una alteración del grupo activo, cromóforo, de la proteína; efectivamente, trabajando con ferredoxina de *Clostridium* Malkin y Rabi

nowitz (189) sugirieron que la agrupación sensible al oxígeno era el sulfuro inorgánico, que se perdía en forma de SH_2 .

Otra causa de pérdida de SH_2 parece ser, según algunos, los altos y prolongados vacíos, especialmente cuando se efectúan a temperatura ambiente. Tagawa y Arnon (188) sugieren que la ferredoxina de espinaca puede perder todo su azufre lábil por secado en vacío a 60° , y Rao (121) ha observado pérdida de color en la ferredoxina de Colocasia después de liofilizada.

Esta pérdida de SH_2 puede en cierto modo evitarse manteniendo la ferredoxina, tanto en solución como en forma sólida, en un medio moderadamente alcalino. Así, la ferredoxina de maíz es estable por largos períodos en solución tamponada a p.H 7.3, congelada y bajo hidrógeno (110), mientras que los cristales de ferredoxina de *Euglena gracilis* son estables durante 2-3 años en medio ligeramente alcalino bajo nitrógeno (104). En este punto también incide la naturaleza del sistema buffer utilizado, siendo la ferredoxina de *Bumilleriopsis filiformis* (107) muy estable a pH 8.0 con buffer MES, Tricina y, sobre todo, citrato-fosfato, y bastante menos en buffer Tris.

Por otro lado, Cammack (190) y Hall y col. (191) han mencionado que sales del tipo ClNa , $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, etc., tienen el efecto de estabilizar la ferredoxina frente al calor y otros agentes desnaturalizantes, contrarrestando el efecto negativo que sobre la estabilidad pueden tener disolventes orgánicos tipo acetona, metanol, etc.; así, se ha visto que la ferredoxina de maíz disuelta en medios acuosos de baja fuerza iónica acaba desnaturalizándose, aumentando su estabilidad en presencia de altas concentraciones de ClNa (110). Cambios en las características físico-químicas se observan también en presencia de altas concentraciones de urea y guanidina (192), probablemente asocia

dos, como es común con estos agentes, a roturas de puentes de hidrógeno y pérdida de la estructura tridimensional de la molécula.

Dentro de estas características generales existen, no obstante, diferencias en la estabilidad de unas ferredoxinas y otras. Así, las procedentes de *Colocasia* y *Leucaena glauca* muestran mucha mayor estabilidad que la de espinaca, mostrándose también ésta más susceptible al aire que la de *Bumilleriopsis* (107). Por otro lado, la ferredoxina de *Chlorobium thiosulfatophilum* es tan poco estable que sólo puede obtenerse pura si el método de preparación no excede de los tres días (193). La ferredoxina de *Clostridium cylindrosporum* descompone rápidamente al estado cristalino (91), mientras que, por el contrario, la de *Cl. thermosaccharolyticum* constituye un caso de extraordinaria estabilidad al calor (194).

Nosotros, a la vista de todos estos antecedentes, decidimos conservar nuestros preparados de ferredoxinas de espinaca y lechuga en forma seca, liofilizados a un vacío de 15 micrones a temperatura de -40° , en presencia de buffer Tris-ClH pH 7.3. Para evitar una posible pérdida de SH_2 , la liofilización se mantuvo sólo hasta el momento justo de alcanzarse la sequedad. En el matraz donde se efectuó la liofilización se deshizo el vacío por admisión de nitrógeno -del 99.999% de pureza- a una presión de 0.5 kg./cm^2 , conservándose hasta su uso a -30° . La idoneidad del método se comprobó por mantenimiento del coeficiente de absorción antes y después de la liofilización.

Un acontecimiento frecuentemente relacionado con el deterioro de la ferredoxina es su polimerización. La ferredoxina de *Colocasia esculenta* muestra por electroforesis en acrilamida, cuando se conserva en condiciones deficientes, bandas débiles de polímeros de la misma (121), y a este mismo hecho habría

probablemente que referir la indicación de Gersonde y col. (195) de que la ferredoxina de *Clostridium pasterianum* se comporta como monómero o como dímero, dependiendo de las condiciones de aislamiento. Un análisis detallado de este hecho ha sido efectuado por Keresztes-Nagy y Margoliash en relación con la ferredoxina de alfalfa (116). Esta, cuando se deteriora, disminuye su constante de difusión, aumenta el valor de $S_{20,W}$ y da una segunda banda mas lenta en electroforesis en acrilamida, hechos todos - indicativos de una agregación, presumiblemente en forma trímera, como se deduce del cálculo del peso molecular por ultracentrifugación. La existencia de esta agregación viene confirmada por - una disminución de la accesibilidad del hierro a la o-fenantrolina, y de los restos de cisteína a los mercuriales.

Una polimerización aún de mayor grado fué observada en preparados de ferredoxina de espinaca, artificialmente deteriorados por tratamiento ácido (196). Nosotros hemos detectado, tanto en espinaca como en lechuga, la presencia de polímeros, - que responden por su volumen de elución a la categoría de trímeros, en el pase por Sephadex G-75 dentro de la metódica de purificación de algunos lotes.

Si excluimos algunos casos de ferredoxinas atípicas, como la de *Clostridium botulinum* (94), aún no bien definidas, - las características espectrales de los distintos tipos de ferredoxinas se pueden resumir en dos grupos: ferredoxinas con 2Fe, de color rojo, que presentan en forma oxidada dos máximos al visible en la zona de 420 y 460 nm., un máximo en el UV próximo - alrededor de 330 nm., y otro en el UV lejano a 275 nm.; y ferredoxinas con 8Fe, de color marrón, presentando una ancha banda - de absorción en la zona de 380-420) nm, un máximo bien definido a 280 nm, y un hombro mas o menos pronunciado a 300 nm. Las ferredoxinas con un número intermedio de átomos de Fe presentan -

características que las acercan a uno u otro grupo, si bien desde un punto de vista espectral están mucho más cerca de las segundas.

La razón de absorciones entre los máximos $A_{\text{visible}}/A_{280}$ varía para las ferredoxinas 8Fe entre un amplio margen, que va desde 0.58 para la ferredoxina I de *Azotobacter vinelandii* (86) a 0.83 para las de *Clostridium butyricum* y *Cl. tetanomorphum* (91), variabilidad que depende no tanto de diferencias de extinción al visible como de distinta absorción al UV, motivada por ostensibles variaciones en el contenido de aminoácidos aromáticos. Efectivamente, ferredoxinas con razones tan distintas como 0.58, la de *Azotobacter*, y 0.82, la de *Cl. pasterianum* (91), muestran, por el contrario, coeficientes de absorción molar al visible de 27×10^3 y 26.6×10^3 (188), respectivamente, valores prácticamente análogos.

Las ferredoxinas tipo 2Fe, de algas y plantas superiores, muestran también, sobre una homogeneidad de los máximos espectrales, fuertes variaciones cuantitativas de los mismos. En la Tabla XX se exponen para distintas especies los valores de las razones de absorción de los distintos máximos, con relación al máximo del UV lejano. En estos datos, y a título comparativo, se ha prescindido de las pequeñas desviaciones de longitud de onda existentes entre una y otra especie en la exacta localización de los máximos, no teniendo, por tanto, los encabezamientos de la Tabla mas valor que el de identificación de cada máximo del espectro; no obstante, y a continuación de cada valor, se indica entre paréntesis la exacta posición de los mismos. Se incluyen también, para las especies en que se determinó, los valores de los coeficientes de absorción molar correspondientes a la zona 420 nm. del visible. Finalmente, hemos indicado los datos obtenidos por nosotros para las ferredoxinas de espinaca y

TABLA XX

Razones de absorción entre los máximos espectrales, y coeficientes de absorción molar de ferredoxinas de algas y plantas superiores (tipo 2Fe).

	A_{420}/A_{275}	A_{460}/A_{275}	A_{330}/A_{275}	Coef. absorción M a 420 nm.	Referencia
Euglena	0.68 (422/276)	0.60 (465/)	0.87 (328/)	-	(104)
Scenedesmus	0.65 (421/276)	-	0.88 (330/)	-	(105)
Bumilleriosis	0.57 (420/276)	0.51 (465/)	0.76 (330/)	9.1×10^3 (420)	(107)
Porphyridium	0.32 (422/276)	-	-	-	(104)
Chlorella	0.54 (420/275)	-	-	-	(150)
Polystichum	0.65 (420/276)	-	-	-	(119)
Equisetum	0.75 (426/276)	-	-	8.8×10^3 (426)	(122)
Maíz	0.48 (423/277)	0.43 (463/)	0.60 (330/)	10×10^3 (423)	(110)
Colocasia	0.43 (420/277)	0.39 (465/)	0.64 (330/)	9.7×10^3 (420)	(121)
Espinaca	0.49 (420/276)	0.44 (465/)	0.63 (330/)	9.68×10^3 (420)	(188)
Amaranthus	0.47 (420/276)	-	-	-	(119)
Perejil	0.62 (420/275)	0.57 (465/)	0.81 (330/)	-	(111)
Leucaena	0.49 (420/275)	0.43 (465/)	0.65 (330/)	-	(118)
Pisum	Fd.I 0.55 (422/274)	-	-	-	(129)
	Fd.II 0.65 (422/274)	-	-	-	
Alfalfa	0.48 (422/277)	0.43 (465/)	0.65 (331/)	-	(116)
Espinaca	0.49 (422/274)	0.43 (460/)	0.65 (330/)	$*9.95 \times 10^3$ (422)	(nosotros)
Lechuga	0.46 (422/274)	0.41 (460/)	0.66 (330/)	$*9.76 \times 10^3$ (422)	(nosotros)

*Calculado sobre la base de los pesos moleculares 11810 y 12307, valores medios de los obtenidos por centrifugación en gradiente, contenido en Fe y composición en aminoácidos.

lechuga.

De una forma general puede decirse que las razones A_{422}/A_{275} son más altas en las ferredoxinas de Criptógamas -algas y helechos- que en las de Fanerógamas; en este sentido las desviaciones de la pauta general que presentan las ferredoxinas de perejil y Pisum resultan difíciles de explicar, ya que tanto un posible deterioro de la ferredoxina como un impurificación por una proteína extraña incidirían en sentido contrario, al observado. Aunque, como han demostrado Keresztes-Nagy y Margoliash (116), la absorción al UV depende en parte de la presencia de hierro, esta diferencia se debe fundamentalmente a la ausencia de triptófano y al bajo contenido en tirosina que presentan las ferredoxinas de algas y helechos (119,122).

Las características espectrales encontradas por nosotros -posición de los máximos de absorción, razones A_{422}/A_{275} , y coeficiente de absorción M al visible- para la ferredoxina de espinaca son, salvo ligerísimas variaciones dadas para la misma. Por lo que respecta a la ferredoxina de lechuga, presenta una localización de máximos de las bandas de absorción totalmente coincidente con la de espinaca analizada por nosotros, y una razón de absorciones del mismo orden, quizás -ligeramente inferiores para las bandas del visible: 0.46 frente a 0.49 para la razón A_{422}/A_{274} , y 0.43 frente a 0.41 para la A_{460}/A_{274} . Los coeficientes de absorción molar a 422 nm. encontrados por nosotros en espinaca y lechuga son también equivalentes y comparables a los anteriormente descritos en espinaca y otras ferredoxinas de plantas superiores.

Todos estos datos confirman la homología de la ferredoxina de lechuga con las de otras plantas y el hecho, extensivo a las ferredoxinas de algas, que la absorción en la zona de los 420 nm. está tan vinculada al centro activo Fe-S, que resulta proporcional al número de átomos de hierro. Este principio

es aproximadamente válido también para las ferredoxinas tipo -8Fe, y aún para las de contenido intermedio en hierro. Quizás - el ejemplo más demostrativo sea el de la bacteria púrpura no azufrada *Rhodospirillum rubrum*, que poseyendo ~~dos~~ ferredoxinas con 6 y 2 átomos de hierro, presentan coeficientes de extinción molar a 385 nm. de 24×10^3 y 8.8×10^3 , respectivamente (127).

La reducción reversible de la ferredoxina de lechuga hace descender la extinción de la banda de absorción a 422 nm. a un valor ligeramente inferior a la mitad, igual que le ocurre a la proteína de espinaca. Para esta última ya, Tagawa y Arnon (188) encontraron que el coeficiente de absorción molar de la forma oxidada, 9.68×10^3 , descendía a 4.55×10^3 después de la reducción, lo que representa una disminución del mismo orden; y en la ferredoxina del alga *Bumilleriopsis filiformis* (107) la forma reducida presenta una absorción del 48% respecto a la oxidada. El descenso por reducción del valor de la extinción en la otra banda del visible, a 460 nm, es aún mayor, llegando en la ferredoxina de lechuga a ser 2.4 veces menor.

Esta pérdida por reducción de aproximadamente el 50% del color puede tener una explicación quizás pueril por lo sencilla. En las ferredoxinas tipo 2Fe se ha demostrado que ambos hierros se encuentran, en la forma oxidada, al estado de Fe^{3+} (197), pasando por reducción uno de ellos a la forma Fe^{2+} , toda vez que esta molécula actúa como transportador reversible de un solo electrón (108,198,199,200). Según esto, la absorción al visible hay que considerarle vinculada al estado Fe^{3+} de los dos átomos de hierro del centro cromóforo, quedando reducida a la mitad cuando uno de éstos pasa al estado Fe^{2+} . En apoyo de esta hipótesis está el total blanqueamiento que experimentan las ferredoxinas tipo 2Fe cuando se reducen irreversiblemente por un exceso de ditionito, lo que tiene lugar por un pase de ambos

hierros a la forma ferrosa (201).

La determinación del punto isoeléctrico de las ferredoxinas encierra especial dificultad, dada su conocida labilidad a pH ácido. Los métodos existentes para la medida de esta constante se basan en la inmovilización que la proteína a testar experimenta cuando se encuentra sometida a un campo eléctrico en un medio de pH análogo a su punto isoeléctrico, determinación que, dado que éste se encuentra para las ferredoxinas en la zona ácida, resulta incompatible con su estabilidad. Quizás por ello sean tan escasísimas las veces en que esta medida se ha efectuado. Lovenberg y col. (91) determinan el punto isoeléctrico de la ferredoxina de *Clostridium pasterianum* efectuando una serie de desarrollos electroforéticos en gel de almidón a distintos pH, midiendo en cada caso la movilidad de la proteína. Por este método calculan por extrapolación -ya que les resulta imposible usar valores de pH inferiores a 4, y llegar a las condiciones de movilidad nula- un valor de 3.7, lógico dado su escaso contenido en aminoácidos básicos y su alto porcentaje en ácidos.

El carácter ácido es una circunstancia general de todas las ferredoxinas, existiendo no obstante oscilaciones o sensibles en el valor del punto isoeléctrico derivadas, no sólo de diferencias en el contenido de aminoácidos, sino de modificaciones en la estructura primaria. Así, Lee y col. (125) han demostrado que, poseyendo las ferredoxinas de espinaca y juncia una composición muy similar en aminoácidos, muestran diferencias patentes en su punto isoeléctrico y en la secuencia de los mismos.

La técnica de electroenfoque utilizada por nosotros -en circunstancias normales más sencilla, rápida y precisa que

las repetidas electroforesis a distintos pH del método tradicional- ha presentado en este caso los mismos inconvenientes derivados de la inestabilidad a pH ácido de este tipo de compuestos. A medida que la ferredoxina se va focalizando mas y mas en su zona de pH isoelectrico, va experimentando una progresiva decoloración e insolubilización, con aparición de flóculos. No obstante, y aunque las absorciones a 422 nm. se encuentran en ese punto muy disminuidas, hemos conseguido localizar la posición de la ferredoxina focalizada y, por interpolación dentro del gradiente de pH establecido, determinar su punto isoelectrico, 4.4 para la de espinaca, y 4.7 para la de lechuga.

Han sido muy escasas las veces en que se han efectuado una determinación directa de potencial redox en ferredoxinas. La técnica es compleja, basándose en el establecimiento, en condiciones anaerobias, de situaciones de equilibrio del sistema ferredoxina con otro que tenga un potencial redox del mismo orden, y cuyas formas oxidada y reducida sean susceptibles de cuantificación independiente, de forma compatible con las de la ferredoxina. Los sistemas usados se limitan al metilviológico, con determinación colorimétrica de su forma reducida, y al H_2 -hidrogenasa, con determinación manométrica a pH constante de la presión hidrógeno, ó potenciométrica a presión de hidrogeno constante del cambio de pH. Este es el mas cómodo que aquel desde el punto de vista de la medida experimental, pero presenta el inconveniente de necesitar hidrogenasa como nexo del transporte electrónico entre el gas hidrógeno y ferredoxina.

En este último sentido dirigimos nosotros en un principio la metodología a usar, pero la dificultad de obtener preparados operativos de hidrogenasa nos hizo renunciar a favor del empleo del metilviológico. Usando hidrogenasa, Tagawa y Arnon (9) calcularon previamente para la ferredoxina de Cl. pas-

terianum un valor de potencial redox de -410 mV, que posteriormente (188) corrigieron a -390 mV usando la misma técnica, diferencias debidas a una reconocida parcial inactivación de la hidrogenasa en la primera determinación.

En la Tabla XXI se exponen los valores de potencial redox obtenido hasta la fecha para las distintas ferredoxinas, junto con el método empleado. En el caso de Chromatium se utilizó un procedimiento indirecto, basado en la particularidad que presentan las ferredoxinas de bacterias fotosintéticas de reducirse al 100% fotoquímicamente en presencia de cloroplastos, - mientras que la reducción es sólo del 24% por el sistema H_2 -hidrogenasa, y del 62% por ditionito -a diferencia de las ferredoxinas de cloroplastos y Clostridium, que lo hacen al 100% por este reactivo-; la interpolación para una reducción del 50% da un valor de potencial redox atribuible a la ferredoxina ensayada.

En la Tabla incluimos también los valores obtenidos por nosotros para las ferredoxinas de espinaca y lechuga. análogo el primero al anteriormente calculado para esta especie, y del mismo orden el obtenido para la lechuga. Este valor, el segundo que se determina, después del de espinaca para una ferredoxina procedente de cloroplastos, confirma la homología de este grupo de ferredoxinas en relación con su capacidad reductora y de transporte electrónico.

La identificación de los compuestos que exhiben mayor electronegatividad en los sistemas biológicos ha sido un punto muy ligado al desarrollo de la bioquímica. Este papel, al principio adscrito a los piridín-nucleóticos, fué adjudicado rápidamente a las ferredoxinas al descubrirse éstas, pues se pensó que valores de potencial redox tan bajos como los -410 mV y -420 mV encontrados respectivamente, para las ferredoxinas de espinaca y

TABLA XXI

Potenciales redox determinados hasta la fecha para distintos tipos de ferredoxinas, con indicación del método utilizado.

<u>Especie</u>	<u>E₀</u>	<u>Método utilizado</u>	<u>Referencia</u>
Chromatium	-490mV		(18)
Azotobacter vinelandii:			
Fd II	-460mV	Metilviológeno	(86)
Fd I	-420mV	Metilviológeno e H ₂ -hidrogenasa	(86)
Espinaca	-420mV	H ₂ -hidrogenasa	(188)
Cl. pasterianum	-410mV	H ₂ -hidrogenasa	(9)
	-390mV	H ₂ -hidrogenasa	(188)
Bacillus polymyxa	-390mV	H ₂ -hidrogenasa	(101)
Espinaca	-419mV	Metilviológeno	(nosotros)
Lechuga	-425mV	Metilviológeno	(nosotros)

Clostridium difícilmente podrían ser superados (9,89). Independientemente de la existencia de ferredoxinas, como luego veremos, aún más electronegativas, el hecho de que el fotosistema I pudiera reducir colorantes de potencial redox inferior al de las ferredoxinas (67,202) -como el metilviológeno, con un potencial alrededor de -0.45 V- implicaba la existencia en los cloroplastos de un componente más electronegativo.

Yocum y San pietro (203) aislaron de espinacas una proteína con grupo prostético flavínico, capaz de reducir a la ferredoxina en la oscuridad cuando previamente, en atmósfera estrictamente anaerobia, había sido aquella fotoreducida por cloroplastos aislados; en consecuencia, fué considerada como el aceptor primario de electrones del fotosistema I, llamándosele "ferredoxin-reducing substance" (FRS), y calculándosele un potencial redox alrededor de -0.48 V. Sin embargo, Tsujimoto y col. (204) comprobaron posteriormente que cloroplastos privados de FRS se guían reduciendo fotoquímicamente la ferredoxina, mientras que paralelamente otros investigadores (130, 131, 132, 205) detectaban la presencia de una sulfoferroproteína ligada a las estructuras cloroplásticas- "ferredoxina ligada"-, que se comportaba como el aceptor primario de electrones de las partículas P-700 del fotosistema I. Su posible aislamiento ha sido señalado con posterioridad (206), comportándose como una proteína de tan bajo potencial redox que se reoxida instantáneamente, aún en anaerobiosis, cuando cesa la iluminación. No obstante, su papel de aceptor primario de electrones ha sido puesto en duda, pues los centros P-700 siguen cediendo fotoquímicamente electrones en presencia de este material reducido (207).

Como ha podido observarse, los potenciales redox de las ferredoxinas de espinaca y lechuga han sido calculados sobre la base de que el mecanismo de óxido-reducción de las mismas

implica la transferencia de un solo electrón. Este hecho ha sido muy controvertido hasta fechas recientes. En sus estudios iniciales, Tagawa y Arnon (9) postularon que la ferredoxina de *Cl. pasterianum* actuaba transportando un electrón, cosa posteriormente extendida a la ferredoxina de espinaca por Whatley y col. (108) y Horio y San Pietro (198). Que el mecanismo de óxido-reducción de la ferredoxina de espinaca -y por extensión todas las de tipo 2Fe, de algas y plantas superiores- implica la transferencia de un solo electrón, ha sido luego ampliamente confirmado (12, 199, 200) por distintos procedimientos. Esta parece ser también la situación para las ferredoxinas bacterianas tipo 4Fe (101, 200). Por el contrario, estas mismas técnicas mostraron que la ferredoxina de *Cl. pasterianum* -y por extensión, todas las de tipo 8Fe- actuaba como transportador de dos electrones (199, 208), tesis tan defendida por Sobel y Lovenberg (89), como negada por Tagawa y Arnon (188). Posteriores investigaciones efectuadas por Eisenstein y Wang (209) parecen poder reconciliar ambas hipótesis en el sentido de que la ferredoxina clostridiana puede teóricamente admitir 2 electrones, como se deduce de experiencias de titulación química, aunque desde un punto de vista biológico actúe transportando un solo electrón. Esto guarda completo acuerdo con el hecho comprobado por Forti y col. (210) de que la ferredoxin-NADP-reductasa actúa también "in vivo" transportando un solo equivalente de reducción.

Recientemente, no obstante, se ha visto que la situación puede ser mucho más complicada para algunas ferredoxinas tipo 8Fe. Así, Sweeney y col. (211) han comprobado que los dos centros 4Fe de la ferredoxina I de *Azotobacter vinelandii*, uno de ellos muestra un potencial redox de -420 mV, típico de ferredoxina, mientras que el otro es de +340 mV, típico de sulfoproteínas de alto potencial, del mismo orden que el valor -

+350 mV descrito para la aislada de Chromatium (212). Carter y col. (213) han encontrado que los centros 4Fe de ferredoxinas bacterianas y de sulfoferroproteínas de alto potencial son fundamentalmente idénticos, siendo análogos en las formas oxidadas de aquéllas y reducidas de éstas los estados de oxidación de los átomos de hierro: $2\text{Fe}^{2+}3\text{Fe}^{3+}$. A partir de este estado se pasa al $1\text{Fe}^{2+}3\text{Fe}^{3+}$ de las sulfoferroproteínas de alto potencial en forma oxidada, o al $3\text{Fe}^{2+}1\text{Fe}^{3+}$ de las ferredoxinas en forma reducida, posibilidad que en definitiva depende de diferencias secuenciales de la estructura primaria en la zona polipeptídica que rodea al centro activo (214).

Los métodos utilizados para la determinación de pesos moleculares de ferredoxinas vienen condicionados por el reducido tamaño molecular de sus moléculas. Así, el clásico procedimiento de electroforesis en gel de acrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico resulta aquí inviable por la necesidad de utilizar geles de muy alta densidad de malla, difíciles de preparar y manejar, sin contar con la probable desintegración del centro cromóforo por la acción del lauril-sulfato. Aunque la filtración molecular por geles Sephadex -generalmente G-75 o G-100- ha sido usada en la determinación del peso molecular de las ferredoxinas de Colocasia (121) y Chlorella (103), su uso presenta las limitaciones derivadas del fuerte carácter hidrófilo de estos compuestos, con la aparición de fenómenos de adsorción sobre los geles de dextrano, y posterior retraso de la elución normal de la proteína. Finalmente, las técnicas de centrifugación en gradiente y elución posterior, que tan magníficos resultados dan con proteínas de mayor magnitud molecular, muestran los inconvenientes debidos a la alta tasa de difusión de los compuestos de bajo peso molecular, necesitándose centrifugaciones muy prolongadas para conseguir sedimentaciones concretas,

sin que se puedan evitar las difusiones posteriores durante el transcurso de la elución. Por otro lado, todos estos métodos requieren el uso de standards, precisamente de una magnitud molecular en la que no son muy abundantes.

Los métodos más utilizados han sido los de ultracentrifugación analítica, y los indirectos que atienden, bien al contenido en hierro, bien a la composición en aminoácidos. Los primeros, considerados quizás los más precisos para proteínas en general, presentan en el caso de las ferredoxinas la dificultad de la alta densidad de estas moléculas, consecuencia de su elevado contenido en hierro, lo que obliga para la obtención de resultados correctos al cálculo paralelo del volumen específico parcial. Así, el valor primitivo 12000 dado por Tagawa y Arnon (9) para la ferredoxina de *Cl. pasterianum*, calculado sobre la base de un volumen específico parcial 0.73, típico de muchas proteínas, fué corregido posteriormente por Lovenberg y col. (91) a 6000 cuando se aplicó el volumen específico parcial 0.63 de este compuesto. La influencia de la densidad de la proteína se puede deducir observando la evolución que sigue el volumen parcial en los distintos tipos de ferredoxinas, consecuencia de su diferente magnitud molecular y distinto contenido en hierro (Tabla XXII).

Tabla XXII

Contenido en hierro, peso molecular y volumen específico parcial de distintos tipos de ferredoxinas.

	Atomos de		Vol. sp. parcial	Referencia
	Fe/mol	p.m.	(ml./g.)	
<i>Cl. pasterianum</i>	8	6000	0.63	(91)
<i>Azotobacter</i>	8	14000	0.67-0.68	(86)
<i>Bumilleriopsis</i>	2	12000	0.71	(107)

Por otro lado, el cálculo del peso molecular a través de los datos proporcionados por el contenido en hierro o análisis de aminoácidos suministra buenos resultados, supuesto que por una técnica paralela conozcamos, al menos el orden de magnitud del peso molecular, a partir del cual seleccionar el valor más probable.

La ultracentrifugación en gradiente de sacarosa nos dió un valor de peso molecular para ambas ferredoxinas del orden de 12380, cuando se comparaban sus posiciones de equilibrio con la del citocromo C, standard de sedimentación más próxima a la de las ferredoxinas estudiadas y que, por ser también una ferroproteína, exhibe un bajo volumen específico parcial (215), - del mismo orden que el citado mas arriba para la ferredoxinas - tipo 2Fe del alga *Bumilleriopsis filiformis*.

De acuerdo con la composición en aminoácidos, y tomando como base de referencia un contenido de 8 restos de leucina, hemos obtenido pesos moleculares de 10690 y 11300, respectivamente, para las cadenas polipeptídicas de las ferredoxinas de espinaca y lechuga. A una normalización también de 8 restos de leucina llegan Crawford y Jensen (110) con la ferredoxina de maíz. Teniendo en cuenta, según veremos, que ambas ferredoxinas poseen 2 átomos de hierro y 2 grupos S^{2-} por molécula, obtuvimos los valores definitivos 10870 y 11480, asimilables al anteriormente determinado por centrifugación en gradiente, y a los 12180 y 13060 atendiendo al contenido en hierro.

Los valores bibliográficos sobre el peso molecular - de la ferredoxina de espinaca han ido sufriendo correcciones progresivas con el tiempo. Efectivamente, el primitivo valor 17000 dado por Apella y San Pietro (196) fué reducido a 14000 por Watley y col. (108), y al definitivo 11640 por Tagawa y Arnon (188),

TABLA XXIII

Pesos moleculares de distintos tipos de ferredoxinas.

<u>Origen</u>	<u>Peso molecular</u>	<u>S_{22,w}</u>	<u>Referencia</u>
Bacterias no fotosintéticas (Clostridium pasterianum, Bacillus polymyxa, Desulfovibrio gigas, etc.)	6000 - 9000	1.4 S	(22,91,102)
Bacterias no fotosintéticas fijadoras de N ₂ (Azotobacter vinelandii, etc.)	14000		(86)
Bacterias fotosintéticas (Chromatium, Chlorobium, Rhodospirillum, etc.)	6000 - 10000	1.3 S	(18,19,127,136)
Algas procariotes (Anacystis, Nostoc, etc.)	11000		(80)
Algas eucariotes (Scenedesmus, Chlorella, Euglena, Bumilleriopsis, etc.)	11000 - 12000		(104,105,107,150)
Plantas superiores:			
Spinacia oleracea	11640 (amin.)		(188)
Petroselinum sativum	12200		(111)
Medicago sativa	11200 (amin.)	1.585 S	(116)
Zea mays	10950 (amin.)		(110)
Colocasia esculenta	12000	1.8 S	(121)
Otras especies (Stellaria, etc)	19000		(28)
Espinaca	*10870 (amin.)	1.74 S	(nosotros)
Lechuga	*11480 (amin.)		(nosotros)

*No se considera el contenido en triptófano, no determinado.

atendiendo al contenido en aminoácidos, Fe y S^{2-} . Nosotros, según este último método, hemos obtenido valores prácticamente del mismo orden, homologables también a los dados para ferredoxinas de otras plantas superiores. En la Tabla XXIII se relacionan los pesos moleculares correspondientes a los distintos tipos de ferredoxinas, detallando los encontrados para las procedentes de plantas superiores. Llama la atención los altísimos valores, alrededor de 19000, encontrados por Davenport y Hill (28) en una serie de especies, solamente explicables por la antigüedad de la referencia. En la misma Tabla se indican los valores del coeficiente de sedimentación en aquéllos casos en que se ha determinado.

La composición en aminoácidos, en base a 8 restos de leucina, nos dió para la ferredoxina de espinaca un número total de 99 residuos, frente a los 97 encontrados anteriormente para la ferredoxina de esta misma procedencia (137). Esta diferencia afecta sólo al ácido aspártico, para el que hemos encontrado dos restos más, al ácido glutámico y metionina, con un resto más cada uno, y al valor $\frac{1}{2}$ cistina, con un resto menos; hay que indicar, además, que se ha señalado la existencia de un resto de triptófano, cosa que no hemos podido confirmar al no haber sido determinado por nosotros. Todos los restantes aminoácidos, hasta 13, muestran un contenido completamente análogo, tal como puede verse en la Tabla XXIV. En ésta se recogen, junto con los valores encontrados por nosotros para las ferredoxinas de espinaca y lechuga; los correspondientes a distintos tipos de ferredoxinas, incluyéndose todos los hasta ahora aparecidos sobre ferredoxinas de plantas superiores.

En la ferredoxina de lechuga se cumplen todas las conclusiones deducidas para ferredoxinas de plantas:

a) Un bajo contenido en aminoácidos básicos, especialmente arginina e histidina, aunque no tan acentuado como en las ferredoxinas bacterianas, en que estos dos aminoácidos pueden llegar a anularse.

b) Un alto contenido en los ácidos aspártico y glutámico, con igual o mayor incidencia del segundo que el primero, a diferencia de lo que sucede con las ferredoxinas de algas, en que el ácido aspártico supera ampliamente al glutámico (80,105).

c) Una relevante presencia de los aminoácidos fenilalanina y tirosina que, junto al triptófano, son reponsables de la fuerte absorción al UV de estos compuestos. En este sentido se diferencian de las ferredoxinas bacterianas y de algas, guardando las de helechos una posición intermedia. Una excepción en este punto, como en muchos otros -número total de restos, peso molecular, etc. -, lo que constituye la ferredoxina de Azotobacter.

d) A diferencia de lo señalado anteriormente, nosotros hemos detectado la presencia de metionina en la proteína de espinaca. También hemos encontrado la existencia de un resto de metionina en la ferredoxina de lechuga, al igual que otros autores en amaranto (119) y algodón (115). Por el contrario, no se ha encontrado en las otras ferredoxinas de plantas superiores estudiadas, aunque en relación con esto hay que indicar que en maíz se ha detectado en los aminogramas la existencia de un pequeño pico de metionina, que los autores desprecian al hacer la normalización de la proteína sobre la base de 8 restos de leucina (110).

e) Hemos calculado la existencia de 4 equivalentes de $\frac{1}{2}$ cistina tanto en la ferredoxina de espinaca como en la de lechuga, a diferencia de los 5 hallados anteriormente en aquella. Sin embargo, como luego veremos, hemos deducido por titulación

TABLA XXIV

Composición en aminoácidos de ferredoxinas de distinta procedencia

	Bacterias no fotosintét. no fijadoras de N ₂		Bacterias no fotosintét. fijadoras de N ₂		Bacterias fotosintét.	Algas	Helechos	Plantas superiores								
	Cl.pasterianum (90)	Desulfovibrio (135)	Bacillus polymyxa (101)	Azotobacter (86)				Chromatium (136)	Euglena (104)	Equisetum (122)	Colocasia (121)	Leucaena (118)	Amaranthus (119)	Espinaca (137)	Algodón (115)	Alfalfa (116)
Lisina	1	1	3	6	2	5	4	5	5	4	4	3	5	3	4	5
Histidina	0	0	0	2	2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2
Arginina	0	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	2
A. aspártico	8	11	16	15	8	14	8-9	10	10	12	13	16	9	13	15	14
A. glutámico	4	9	8	20	16	9	15-16	15	16	14	13	18	16	14	14	14
Treonina	1	0	6	4	6	9	7	6	4	8	8	4	6	5	8	7
Serina	5	3	3	2	4	8	8	8	7	8	7	6	8	8	7	9
Prolina	3	4	4	9	5	4	4	4	4	4-5	4	4	3	4	4	6
Glicocola	4	1	7	4	5	7	9	9	6	6	6	8	7	8	6	9
Alanina	8	6	11	8	3	8	6	6	7	10	9	8	9	8	9	6
Valina	6	5	2	10	6	6	6	10	6	5	7	8	9	10	7	8
Isoleucina	5	5	7	7	6	4	5	4	4	6	4	4	4	5	4	4
Leucina	0	1	3-4	8	3	7	8	6	9	6	8	6	6	8	8	8
Fenilalanina	1	1	2	5	0	3	4	2	3	1	2	3	2	1	2	3
Tirosina	1	0	0-1	2	3	1	2	4	3	4	4	2	4	5	4	3
Triptófano	0	0	ND	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	ND	ND
Metionina	0	2	0	7	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1
½ Cistina	8	6	4	10	9	6	4	5	5	5	5	4	5	4	4	4
Total restos	55	56	77-79	113	81	93	93-95	97	96	97-98	97	99	97	100	99	105

con mercuriales la existencia de 5 restos de cisteína en la proteína de lechuga, aunque se ha mantenido el valor 4 en la de espinaca. En cualquier caso se cumple la necesidad, en las ferredoxinas tipo $2Fe$, de los 4 restos como mínimo de cisteína, a fin de hacer posible la estructura siguiente del centro activo de estas proteínas (201):

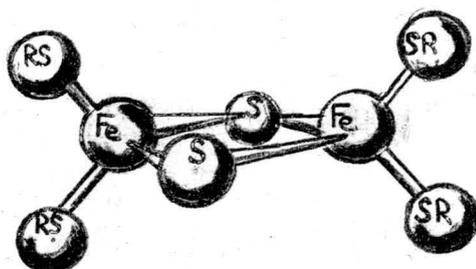


Fig. 34

Cuatro restos de cisteína han sido señalados también en la ferredoxina de algodón (115), maíz (110) y cola de caballo (122).

Hasta hace relativamente poco (15) sólo dos grandes grupos de ferredoxinas eran admitidos en relación a su contenido en hierro, con 2 u 8 átomos del mismo. No obstante, mientras existía cierta unanimidad de criterio - a reserva de las pocas especies estudiadas- para las primeras, no lo era así - para las segundas, describiéndose ferredoxinas - aún dentro de una misma especie bacteriana- con número variable entre 5 y 8 átomos de hierro por molécula (87,91,216,217). Aunque la mayoría de las veces estas diferencias eran debidas a deficiencias metodológicas, se admite actualmente la existencia de ferredoxinas con 4 y 6 átomos de hierro por molécula, cubriendo así las ferredoxinas bacterianas, junto con las de 2 y 8 átomos, un

un amplio espectro de contenido en hierro.

De igual forma, prácticamente todas las ferredoxinas hasta el presente estudiadas muestran un contenido en azúfre - lúbil análogo al del hierro en concentraciones molares, y a tal composición obedecen los esquemas de centro activo propuestos para los núcleos $2\text{Fe}-2\text{S}^{2-}$ y $4\text{Fe}-4\text{S}^{2-}$ (201). Sólo han sido descritas dos excepciones a esta norma, en el alga procariote *Anacystis nidulans* (80) y en la eucariote *Bumilleriopsis filiformis* (107), cuyas ferredoxinas contienen 2 átomos de hierro, pero sólo un grupo S^{2-} . Es evidente que para ellas no resulta válida la estructura de centro activo propuesta para las ferredoxinas cloroplastídicas.

La determinación de hierro en la ferredoxina nativa es muy problemática por la difícil accesibilidad al mismo del reactivo quelante responsable de la reacción coloreada: habitualmente o-fenantrolina para Fe^{2+} , y Tiron (pirocatecol-3,5-disulfonato) para Fe^{3+} (113,189). Esto obliga al uso de desnaturizantes que rompan la estructura tridimensional de la proteína, o a efectuar la determinación previa mineralización de la muestra. En cualquier caso resulta muy difícil mantener los distintos átomos de hierro en su estado original de oxidación en la ferredoxina nativa, ya que este elemento tiende a pasar a forma ferrosa por el SH_2 que la proteína libera en la reacción coloreada (220).

Por esta razón nosotros hemos hecho una determinación global de hierro por absorción atómica, sin matización de su estado de oxidación, habiendo obtenido tanto en espinaca como

en lechuga un contenido de 2 átomos de Fe por molécula de ferredoxina. Análogamente, hemos calculado la existencia de 2 moles de S^{2-} por mol de proteína, con lo que la ferredoxina de lechuga queda incorporada al grupo de las ferredoxinas de algas y otros vegetales superiores. Keresztes-Nagy y Margoliash (116) introducen para la proteína de alfalfa una modificación al método de Lovenberg y col (91) de determinación de S^{2-} , ya que para evitar la aparición del precipitado debido a la matriz protéica de la ferredoxina, acidifican ésta y recogen en corriente de nitrógeno sobre acetato de cinc alcalino el SH_2 desprendido.

Mediante el bloqueo previo de los grupos $-SH$ con mercuriales Blomstrom y col. (221) y Sobel y Lovenberg (89) concluyeron que la forma oxidada de la ferredoxina de *Cl. pasteurianum* presenta la mitad de su contenido en hierro en forma trivalente. Por el contrario, determinaciones paralelas mostraron que la proteína de espinaca exhibe ambos átomos de hierro en forma Fe^{3+} , deduciéndose por medidas de EPR que de ellos uno pasa a forma Fe^{2+} al reducirse la ferredoxina (10,200,208), con aparición de paramagnetismo y resonancia en la zona $g=1.94$. A análogas conclusiones han llegado Dunham y col. (222) por aplicación de la espectroscopía Mössbauer, confirmando además por esta técnica la existencia de una simetría tetrahédrica ya adelantada por Britzinger y col. col. (223) alrededor de ambos hierros, siendo dos posiciones de la misma comunes y ocupadas por ambos S^{2-} , y estando las otras cuatro sostenidas por restos $RS-$ (Fig.34).

De lo expuesto no debe, sin embargo, deducirse la existencia de una situación puramente iónica para los átomos de hierro, con estados formales de oxidación. Al igual que sucede en las ferredoxinas con centros $4Fe-4S^{2-}$, éstos exhiben -

un alto grado de covalencia en la proteína nativa, como lo prueba el hecho de que la ferredoxina de *Cl. pasteurianum* no incorpore 59Fe^{3+} o 59Fe^{2+} por intercambio con el medio, mientras que sí lo hace una vez deshecho el centro activo por tratamiento con un mercurial (91).

La estequiometría de la reacción con mercuriales es un dato analítico muy significativo. En general, todas las ferredoxinas ensayadas muestran sus grupos $-\text{SH}$ accesibles al mercurial, en contra de lo que ocurre con los agentes alquilantes y el DTNB, sólo operativos en presencia de altas concentraciones de urea (91, 224) o guanidina (217). Sin embargo, la tasa de reacción no es la misma con todas las ferredoxinas; así, mientras que la ferredoxina de espinaca reacciona rápidamente con p -hidroximercuribenzoato, la procedente de *Cl. pasteurianum* lo hace más lentamente, siendo extremadamente lenta en reaccionar la de *Azotobacter* (86).

Patering y Palmer (224) encuentran con la ferredoxina de espinaca una estequiometría de 9 equivalentes de mercurial por mol de proteína lo que, teniendo en cuenta que cada mol de S^{2-} consume en la titulación 2 equivalentes de aquél, viene a indicar la existencia de 5 grupos $-\text{SH}$ titulables. Valores análogos han sido encontrados en la ferredoxina de alfalfa (116), y por nosotros en la de lechuga. Sin embargo, los resultados paralelos de comprobación que hemos obtenido con la ferredoxina de espinaca han sido sólo de 4 restos $-\text{SH}$, igual que los determinados por Rao en la ferredoxina de *Colocasia* (121).

Los 5 grupos $-\text{SH}$ titulables determinados en la ferredoxina de lechuga parecen entrar en conflicto con los 4 restos de $\frac{1}{2}$ cistina que hemos determinado en la misma por oxidación per fórmica. Lo inverso ha ocurrido con la ferredoxina de *Colocasia*

(121), que teniendo 5 restos de $\frac{1}{2}$ cistina admite sólo 8 equivalentes de mercurial por mol, de los que 4 se determinan por absorción atómica como Hg una vez separados por diálisis. Ambas diferencias en un sólo resto podrían explicarse a la luz del método de titulación, bien por sobrepasarse la situación de equivalencia con la última adición de mercurial, bien por dificultades estéricas en la titulación del quinto resto. En cualquier caso, estos restos confirman la existencia, al menos, de los 4 restos -SH que, como dijimos anteriormente, resultan necesarios para el centro activo de las ferredoxinas tipo $2\text{Fe}-2\text{S}^{2-}$, descartando la presencia de las agrupaciones -S-S- propuestas por Bayer y Josef (225).

Por primera vez en estudios con ferredoxinas hemos empleado nosotros la tiol-Sepharosa 4B como test de accesibilidad del centro activo de las mismas. La falta de fijación de la proteína nativa indica una localización profunda del resto activo, así como la no existencia de restos de cisteína superficiales; lo primero resulta sorprendente dado el bajo peso molecular de estos compuestos, y lo segundo bastante lógico si consideramos el contenido de 4-5 restos de cisteína por mol de proteína, de los que 4 como mínimo han de formar parte del centro activo. Esta inaccesibilidad del grupo -S-S- piridínico de la tiol-Sepharosa frente a la comprobada accesibilidad del mercurial podría explicarse en función de un mayor volumen de aquél en comparación con el resto -HgOH del mercurial, impidiendo la penetración en la malla tridimensional de la proteína. Recientemente Que y col. (226) han demostrado que los centros activos Fe-S de muchas sulfoferroproteínas pueden ser "sacados" del interior de la matriz de dimetilsulfóxido, se trata la proteína con un exceso de tiofenol; en tales condiciones sería interesante comprobar el comportamiento de las ferredoxinas frente a la tiol-Sepharosa.

Previa incubación con urea 8M la fijación resultó ser cuantitativa, pero en tales condiciones es previsible que haya ocurrido, no sólo una ruptura de la estructura tridimensional de la proteína, sino también una degradación del centro activo. Esto viene confirmado con la pérdida de color y por la irreversibilidad de la desnaturalización por urea que, hemos comprobado, ocurre una vez eliminada ésta por diálisis. Efectivamente, Petering y col. (227) encuentran que la desnaturalización de la ferredoxina clostridiana con urea conduce a la formación de una apoproteína que ya carece de hierro, si bien mantiene aún ligado el azufre inorgánico; en tales condiciones la reconstitución de la ferredoxina nativa implica la adición de hierro a la solución de apóferredoxina.

Por el contrario, la apoproteína originada por la acción de un mercurial carece de hierro y azufre lábil, necesiándose para para la reconstitución de la proteína nativa la adición de hierro sulfuro inorgánico (88,228). En cualquier caso, no se han logrado detectar especies moleculares con contenidos en Fe y S^{2-} por debajo de $2Fe-2S^{2-}$ para las ferredoxinas de cloroplastos, y de $8Fe-8S^{2-}$ para las de origen bacteriano (91), lo que ha llevado a concluir a Hong y Rabinowitz (229) que el proceso de constitución de los centros activos de las ferredoxinas sigue la ley del "todo o nada".

Respecto a las pruebas de especificidad en reacciones ferredoxin-dependientes, sólo existen referencias bibliográficas para la ferredoxin-NADP-reductasa. La mayor parte de los ensayos de especificidad están hechos empleando cloroplastos de espinaca como fuente de enzima, aunque en ocasiones se han utilizado los de acelga (121), alfalfa (116) y, ocasionalmente en experiencias cruzadas, los de maíz (110) y *Bumilleriopsis filiformis* (107). Crawford y Jensen (110) obtienen actividades con

cloroplastos y ferredoxina de maíz del orden de $0.64 \mu\text{M}$ de NDAPH/mg. de clorofila/min., que pasan a $1.6 \mu\text{M}$ cuando operan con material de espinaca, valor este último algo mayor el doble que el encontrado por nosotros en esa misma especie.

Con frecuencia los test se han llevado sólo el sentido cualitativo como confirmación de funcionalidad, habiéndose visto que las ferredoxinas de *Polystichum* (119), amaranto (119) y *Anacystis* (80) -un helecho, planta superior y alga, respectivamente- son operativas frente a cloroplastos de espinaca.

Los ensayos con criterio cuantitativo han concluido que entre las ferredoxinas de plantas y las de origen bacteriano existen grandes diferencias de efectividad en la reducción del NADP por cloroplastos iluminados (50), oscilando entre un 24% del control en la bacteria reductora del sulfato *Desulfovibrio gigas*, y un 70% en la bacteria púrpura fotosintética *Chromatium* (125). Con relación a las ferredoxinas de algas y plantas superiores las referencias bibliográficas dicen, por el contrario, que no existen grandes diferencias de operatividad entre ellas; hay, sin embargo, excepciones patentes, como sucede con la ferredoxina de alga *Bumilleriopsis filiformis* (107), operativa frente a cloroplastos de espinaca a un nivel muy inferior con la ferredoxina homóloga.

Nosotros hemos obtenido sólo un 62% de efectividad de la ferredoxina de lechuga frente a la de espinaca, resultado sorprendente si se tiene en cuenta que hemos usado el mismo lote de cloroplastos y que, para obtener resultados rigurosamente comparativos, hemos llevado un estricto control de las concentraciones de ambas ferredoxinas por lectura espectrofotométrica a 422 nm -que elimina cualquier error por deterioro de las mismas- y corrección a sus respectivos coeficiente de absorción molar.

Esta diferencia se ve corroborada por distinta efectividad a nivel de nitrato reductasa y de fructosa-1,6-difosfatasa, con operatividades del 58 y 74%, respectivamente, de la ferredoxina de lechuga frente a la de espinaca. No tenemos referencia del uso de ferredoxinas heterólogas en ensayos de actividad con nitrato reductasa, sólo el hecho comprobado -mencionado ya con anterioridad de que puede ser sustituida por fitoflavina como elemento suministrador en la reducción del nitrato en situaciones de deficiencia en hierro (151).

El problema resulta más complejo con la fructosa-1,6-difosfatasa, pues al no tratarse de una reacción de óxido-reducción es evidente que el mecanismo de activación por la ferredoxina será más útil. El arranque del problema estuvo en la observación hecha por Buchanan y col. (73) de que la ferredoxina reducida era un activador de este enzima, pudiendo ser sustituido casi con análoga efectividad por ditiotreitól, compuesto ditiólfico de bajo potencial redox (-330 mV). Esta activación era inefectiva a pH 8.7, valor óptimo para la actividad FDPasa en ausencia de reductante y con exceso de Mg^{2+} (230); por el contrario, mostraba su efectividad máxima a pH 7.9, condiciones exactamente reinantes en el estroma del cloroplasto iluminado (231). Efectivamente, la fructosa-1,6-difosfatasa muestra "in vivo" actividad en el cloroplasto solo en condiciones de iluminación, e "in vitro" en la oscuridad, a pH alrededor de 7.9, sólo en presencia de ditiotreitól (232).

A la luz de estos resultados se pensó que por iluminación se originaba un reductante, probablemente ferredoxina, que actuaría activando el enzima. Lo que ya no aparece tan claro es cual podría ser el mecanismo de activación. Se ha propuesto la posibilidad de que, gracias al bajo potencial redox de la ferredoxina, se liberen grupos -SH del enzima necesarios para la actividad (232, 233), hecho apoyado por alto contenido en agrupacio-

nes -S-S- que, según los datos suministrados por Buchanan y col. (73), parece poseer la FDPasa.

Sin embargo, si se tratase de un simple mecanismo de reducción de agrupaciones -S-S- resulta difícil explicar la falta absoluta de operatividad que muestra la ferredoxina de Cl. pasterianum (73), con un potencial redox del mismo orden que el de la proteína de espinaca o lechuga y, por supuesto, inferior al del ditiotreitól. En relación con ésto El-Badry (234) ha encontrado fuertes argumentos para pensar que el mecanismo de activación del enzima por ditiotreitól es distinto al de activación por ferredoxina. Finalmente, en este Laboratorio se ha efectuado un estudio de la composición en aminoácidos de la fructosa-1,6-difosfatasa de cloroplastos de espinaca, y hemos encontrado sólo un contenido de 16 restos de $\frac{1}{2}$ cistina, frente a los 210 señalados por el grupo de Buchanan. La diferencia es tan enorme que resulta forzoso someter todos estos datos a revisión.

Que la ferredoxina de lechuga exhiba sólo el 74% de efectividad en relación con la de espinaca, junto con la operatividad nula mostrada por la de origen bacteriano, son argumentos que hablan en favor de un papel mas sofisticado que el deducido de un simple proceso inespecífico de reducción. La alta complejidad estructural que en este Laboratorio se ha visto presente la FDPasa fotosintética (235, 236), junto con el alto papel regulador asignado a la misma (237), hablan también en favor de ello. Parece evidente que los distintos niveles de efectividad con las ferredoxinas estudiadas han de guardar estrechas conexiones con las relaciones genético-estructurales anteriormente comentadas.

CONCLUSIONES

1. Se ha purificado hasta homogeneidad la ferredoxina de hojas de lechuga, con un rendimiento de 18 mgs/Kg de hojas. Por cristalización lenta en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ se obtuvieron magníficos cristales en forma de agujas, con tendencia a agruparse en haces escobiformes.
2. El espectro de absorción exhibe máximos a 460, 422, 330 y 274 nm, con razón de absorciones $A_{422}/A_{274} = 0.46$. Por reducción con ditionito la razón $A_{\text{ox.}}/A_{\text{red.}}$ a 422 nm es de 2.09. El coeficiente de extinción M resultó ser de 9.76×10^3 a 422 nm, y de 21.66×10^3 a 274 nm.
3. El valor del pI es de 4.7, siendo el potencial redox $E'_0 = -0.425$ V a pH 7.7. La determinación del peso molecular dió los valores 12380, 13060 y 11480, por centrifugación en gradiente de sacarosa, atendiendo al contenido en Fe, y en función de la composición en aminoácidos, respectivamente, con un valor medio de 12307.
4. El análisis de aminoácidos muestra un alto contenido en ácidos aspártico y glutámico, y una baja tasa de aminoácidos básicos; los aminoácidos aromáticos aparecen también en cantidad relevante, siendo responsables de la fuerte absorción al UV. El número total de restos es de 105 aminoácidos por molécula de ferredoxina.

5. Existen 2 moles de Fe y 2 moles de azufre lábil -determinado como S^{2-} por mol de ferredoxina. Por oxidación perbórmica se han determinado 4 restos de cisteína-cistina, frente a 5 obtenidos por titulación con p-hidroximerburibenzoato. Todos estos datos son coherentes con la existencia de un centro activo $2Fe-2S^{2-}-4$ cisteínas.
6. La proteína nativa no es fijada por tiol-Sepharosa 4B, siéndolo cuantitativamente previa incubación en urea 8 M. Ello indica una posición no superficial del centro activo, que aparece así localizado en el interior de la malla tridimensional de la proteína.
7. Todas estas características físico-químicas homologan a la ferredoxina de lechuga con las procedentes de algas y otras plantas superiores, de las que se diferencia en el contenido en algunos aminoácidos e, indudablemente, en su estructura primaria.
8. Comparada con la de espinaca, la ferredoxina de lechuga es sólo operativa al 58, 78 y 62 %, respectivamente, frente a preparados purificados de nitrito reductasa, fructosa-1,6-difosfatasa y ferredoxin-NADP-reductasa, procedentes de hojas de espinaca, datos todos que, sobre características generales idénticas, hablan también en favor de la existencia de diferencias secuenciales específicas entre una ferredoxina y otra.
9. El grado de operatividad con la fructosa-1,6-difosfatasa de espinaca -un 78 % de la ferredoxina de lechuga, frente a la correspondiente homóloga- indica la existencia de un mecanismo sofisticado de activación de este enzima por la ferredoxina, y no de un mero proceso de reducción inespecífica.
10. Se ha hecho un estudio paralelo, con fines comparativos, de la ferredoxina de hojas de espinaca, ya anteriormente estudiada.

BIBLIOGRAFIA

1. BEINERT, H. 1973. Development of the field and nomenclature. -
"Iron-Sulfur Proteins" (W. Lovenberg Ed., Academic -
Press, New York-London), vol. 1, p. 1.
2. DRABKIN, D.L. 1951. Metabolism of the hemin chromoproteins. *Physiol. Rev.*, 31, 345.
3. CRANE, F.L., GLENN, J.L. y GREEN, D.E. 1956. Electron transfer -
system. IV. The electron transfer particle. *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 475.
4. ARNON, D.I. 1965. Ferredoxin and photoxynthesis. An iron contain-
ing protein is a key factor in energy transfer during
photosynthesis. *Science*, 149, 1460.
5. SAN PIETRO, A. y BLACK, C.C. 1965. Enzymology of energy conversion
in photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 16, 155.
6. BUCHANAN, B.B. y ARNON, D.I. 1970. Ferredoxins: Chemistry and -
function in photosynthesis, nitrogen fixation, and -
fermentative metabolism. *Advanc. Enzymol.*, 33, 119.
7. NICHOLAS, D.J.D., WILSON, P.W., HEINEN, W., PALMER, G. y BEINERT,
H. 1962. Use of electron paramagnetic resonance spec-
troscopy in investigations of functional metal compo-
nents in micro-organisms. *Nature (London)*, 196, 433.
8. MORTENSON, L.E., VALENTINE, R.C. y CARNAHAN, J.E. 1962. An elec--

- tron transport factor from *Clostridium pasterianum*. -
 Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, 448.
9. TAGAWA, K. y ARNON, D.I. 1962. Ferredoxins as electron carriers in photosynthesis and in biological production and consumption of hydrogen gas. *Nature* (London), 195, - 537.
 10. PALMER, G. y SANDS, R.H. 1966. Magnetic resonance of spinach ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 241, 253.
 11. SHETHNA, Y.I., DER VARTANIAN, D.V. y BEINERT, H. 1968. Nonheme (iron-sulphur) proteins of *Azotobacter vinelandii*. - *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 862.
 12. MOSS, T.H., PETERING, D. y PALMER, G. 1969. Magnetic susceptibility of oxidized and reduced ferredoxins from spinach and parsley and the high potential protein from *Chromatium*. *J. Biol. Chem.*, 244, 2275.
 13. MORTENSON, L.E., MORRIS, J.A. y JENG, D.Y. 1967. Purification, metal component, and properties of molybdoferredoxin and azo ferredoxin. Two of the components of the N-fixing system of *Clostridium pasterianum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 141, 516.
 14. BULEN, W.A. y LE COMTE, J.R. 1966. Nitrogenase system from *Azotobacter*. Two-enzyme requirement for N_2 reduction, ATP-dependent H_2 evolution, and ATP hydrolysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 56, 979.
 15. MALKIN, R. 1973. The chemical properties of ferredoxins. "Iron-Sulfur Proteins" (W. Lovenberg Ed., Academic Press, - New York-London), vol. II, p.1.
 16. TANAKA, M., HANIU, M. y YASUNOBU, K.T. 1970. Primary structure of bovine adrenodoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

17. CUSHMAN, D.W., TSAI, R.L. y GUNSALUS, I.C. 1967. The ferropro--
tein component of a methylene hydroxylase. *Biochem. -
Biophys. Res. Commun.*, 26, 577.
18. BACHOFEN, R. y ARNON, D.I. 1966. Crystalline ferredoxin from the
photosynthetic bacterium *Chromatium*. *Biochim. Biophys.
Acta*, 120, 259.
19. BUCHANAN, B.B., MATSUBARA, H. y EVANS, M.C.W. 1969. Ferredoxin -
from the photosynthetic bacterium *Chlorobium thiosul-*
fatophilum. A link to ferredoxins from nonphotosynthe
tic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 189, 46.
20. YOCH, D.C., BENEMANN, J.R., VALENTINE, R.C. y ARNON, D.I. 1969.
Electron transport system in nitrogen fixation by *Azo*
tobacter. II. Isolation and function of a new type of
ferredoxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 64, 1404.
21. YASUNOBU, K.T. y TANAKA, M. 1973. The types, distribution in na
ture, structure-function, and evolutionary data of -
the iron-sulfur proteins. "Iron-Sulfur Proteins" (W.
Lovenberg Ed., Academic Press, New York-London), vol.
II, p.27.
22. LAISHLEY, E.J., TRAVIS, J. y PECK, H.D. 1969. Aminoacid composi
tion of ferredoxin and rubredoxin isolated from *Desul*
fovibrio gigas. *J. Bacteriol.*, 98, 302.
23. BARTSCH, R.G. 1963. "Bacterial Photosynthesis" (H. Gest, A. San
Pietro y L.P. Vernon Eds., Antioch. Press, Yellow -
Springs, Ohio), p. 315.
24. WEINSTEIN, B. 1969. Archetype correlation between bacterial rub
redoxin and both bacterial and plant ferredoxins. *Bio*
chem. Biophys. Res. Commun., 35, 109.

25. VALENTINE, R.C., JACKSON, R.L. y WOLFE, R.S. 1962. Role of ferredoxin in hydrogen metabolism of *Micrococcus lactilyticus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7, 453.
26. VALENTINE, R.C., BRILL, W.J. y WOLFE, R.S. 1962. Role of ferredoxin in pyridine nucleotide reduction. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 48, 1856.
27. DAVENPORT, H.E., HILL, R., y WHATLEY, F.R. 1952. Natural factor catalyzing reduction of methemoglobin by isolated chloroplasts. *Proc. Roy. Soc. B*, 139, 346.
28. DAVENPORT, H.E. y HILL, R. 1960. A protein from leaves catalyzing the reduction of hemprotein compounds by illuminated chloroplasts. *Biochem. J.*, 74, 493.
29. SAN PIETRO, A. y LANG, H.M. 1958. Photosynthetic pyridine nucleotide reductase. I. Partial purification and properties of the enzyme from spinach. *J. Biol. Chem.*, 231, 211.
30. SAN PIETRO, A. 1959. Photochemical reduction of triphosphopyridine nucleotide by chloroplasts. *Brookhaven Symp. Biol.*, 11, 262.
31. DAVENPORT, H.E. 1960. A protein from leaves catalysing the reduction of metmyoglobin and triphosphopyridine nucleotide by illuminated chloroplasts. *Biochem. J.*, 77, 471.
32. BUCHANAN, B.B. y BACOFEN, R. 1968. Ferredoxin-dependent reduction of nictinamide-adenine dinucleotides with hydrogen gas by subcellular preparations from the photosynthetic bacterium *Chromatium*. *Biochim. Biophys. Acta*, 162, 607.
33. BUCHANAN, B.B. y EVANS, M.C.W. 1969. Photoreduction of ferredoxin and its use in NAD(P)⁺ reduction by a subcellular preparation from the photosynthetic bacterium *Chloro-*

- bium thiosulfatophilum. Biochim. Biophys. Acta, 180, 123.
34. LOVENBERG, W. y SOBEL, B.E. 1965. Rubredoxin; a new electron transfer protein from Clostridium pasterianum. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 54, 193.
 35. VALENTINE, R.C. 1964. Bacterial ferredoxin. Bacteriol. Rev., 28, 497.
 36. BUCHANAN, B.B. 1966. Chemistry and function of ferredoxin. Structure Bonding, 1, 109.
 37. MALKIN, R. y RABINOWITZ, J.C. 1967. Nonheme iron electron-transfer proteins. Ann. Rev. Biochem., 36, 113.
 38. KIMURA, T. 1968. Biochemical aspects of iron-sulfur linkage in non heme iron protein, with special reference to "ferredoxin". Structure Bonding, 5, 1.
 39. HARDY, R.W.F. y BURNS, R.C. 1968. Biological nitrogen fixation. Ann. Rev. Biochem., 37, 331.
 40. HALL, D.O. y EVANS, M.C.W. 1969. Iron-Sulfur Proteins. Nature (London), 223, 1342.
 41. BUCHANAN, B.B. y ARNON, D.I. 1971. Ferredoxins from photosynthetic bacteria, algae and higher plants. "Methods in Enzymology". (A. San Pietro Ed., Academic Press, New York-London), vol. XXIII, p. 413.
 42. TSIBRIS, J.C.M. y WOODLY, R.W. 1970. Structural studies of iron-sulfur proteins. Coord. Chem. Rev., 5, 417.
 43. MORTENSON, L.E., VALENTINE, R.C. y CARNAHAN, J.E. 1963. Ferredoxin in the phosphoroclastic reaction of pyruvic acid and its relation to nitrogen fixation in Clostridium pasterianum. J. Biol. Chem., 238, 794.

44. VALENTINE, R.C. y WOLFE, R.S. 1963. Role of ferredoxin in the - metabolism of molecular hydrogen. *J. Bacteriol.*, 85, 1114.
45. JUNGERMANN, K., THAUER, R.K., RUPPRECHT, E., OHRLOFF, C. y DECKER, K. 1969. Ferredoxin-mediated hydrogen formation from - NADPH in a cell-free system of *Clostridium kluyveri*. - *FEBS Lett.*, 3, 144.
46. WHITELEY, H.R. y WOOLFOLK, C.A. 1962. Ferredoxin-dependent reac- tions in *Micrococcus lactilyticus*. *Biochem. Biophys. - Res. Commun.*, 9, 517.
47. VALENTINE, R.C., BRILL, W.J. y SAGERS, R.D. 1963. Ferredoxin-lin ked diphosphopyridine nucleotide reduction by pyruva- te in extracts of *Clostridium acidurici*. *Biochem. - Biophys. Res. Commun.*, 12, 315.
48. BACHOFEN, R., BUCHANAN, B.B. y ARNON, D.I. 1964. Ferredoxin as a reductant in pyruvate synthesis by a bacterial extract. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 51, 690.
49. ANDREW, I.G. y MORRIS, J.G. 1965. The biosynthesis of alanine by *Clostridium kluyveri*. *Biochim. Biophys. Acta*, 97, 176.
50. BUCHANAN, B.B., BACHOFEN, R. y ARNON, D.I. 1964. Role of ferredo- xin in the reductive assimilation of CO₂ and acetate by extracts of the photosynthetic bacterium *Chromatium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 52, 839.
51. BUCHANAN, B.B. 1969. Role of ferredoxin in the synthesis of o-ke- tobutyrate from photosynthetic and nonphotosynthetic bacteria. *J. Biol. Chem.*, 244, 4218.
52. BUCHANAN, B.B. y EVANS, M.C.W. 1965. Synthesis of o-oxoglutarate from succinate and carbon dioxide by a subcellular - preparation of a photosynthetic bacterium. *Proc. Nat.*

Acad. Sci. U.S., 54, 1212.

53. ALLISON, M.J. y ROBINSON, I.M. 1970. Biosynthesis of α -ketoglutarate by the reductive carboxylation of succinate in *Bacteroides ruminicola*. J. Bacteriol., 104, 50.
54. ALLISON, M.J. y PEEL, J.L. 1971. Biosynthesis of valine from isobutyrate by *Peptostreptococcus elsdenii* and *Bacteroides ruminicola*. Biochem. J., 121, 431.
55. GEHRING, U. y ARNON, D.I. 1971. Ferredoxin-dependent phenylpyruvate synthesis by cell-free preparations of photosynthetic bacteria. J. Biol. Chem., 246, 4518.
56. HOLCEMBERG, J.S. y TSAI, R.L. 1969. Nicotinic acid metabolism. - IV. Ferredoxin-dependent reduction of 6-hydroxynicotinic acid to 6-oxo-1,4,5,6-tetrahydronicotinic acid. - J. Biol. Chem., 244, 1204.
57. JUNGERMAN, K., THAUER, R.K. y DECKER, K. 1968. The synthesis of one-carbon units from CO₂ in *Clostridium kluyveri*. - Eur. J. Biochem., 3, 351.
58. THAUER, R.K., RUPPRECHT, E. y JUNGERMAN, K. 1970. Synthesis of one-carbon units from carbon dioxide via a new ferredoxin dependent monocarboxylic acid cycle. FEBS Lett., 8, 304.
59. D'EUSTACHIO, A.J. y HARDY, R.W.F. 1964. Reductans and electron transport in nitrogen fixation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 319.
60. DERVARTANIAN, D.V., SHETHNA, Y.I. y BEINERT, H. 1969. Purification and properties of two iron-sulfur proteins from *Azotobacter vinelandii*. Biochim. Biophys. Acta, 194, 548.

61. YOCH, D.C. y ARNON, D.I. 1970. Nitrogen fixation system of photosynthetic bacteria. II. Chromatium nitrogenase activity linked to photochemically generated assimilatory power. *Biochem. Biophys. Acta*, 197, 180.
62. WEAVER, P., TINKER, K. y VALENTINE, R.C. 1965. Ferredoxin-linked DNP reduction by the photosynthetic bacteria *Chromatium* and *Chlorobium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21, 195.
63. AKAGI, J.M. 1965. The participation of a ferredoxin of *Clostridium nigrificans* in sulfite reduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 21, 72.
64. SCHMIDT, A. y TREBST, A. 1969. Mechanism of photosynthetic sulfate reduction by isolated chloroplasts. *Biochem. Biophys. Acta*, 180, 529.
65. VALENTINE, R.C., MORTENSON, L.E., MOWER, H.F., JACKSON, R.L. y WOLFE, R.S. 1963. Ferredoxin requirement for reduction of hydroxylamine by *Clostridium pasteurianum*. *J. Biol. Chem.*, 238, 856.
66. RAMIREZ, J.M., DEL CAMPO, F.F., PANEQUE, A. y LOSADA, M. 1966. Ferredoxin nitrite reductase from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, 118, 58.
67. SHIN, M. y ARNON, D.I. 1965. Enzymic mechanisms of pyridine nucleotide reduction in chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, 240, 1405.
68. ARNON, D.I., TSUJIMOTO, H.Y. y McSWAIN, B.D. 1964. Ferredoxin in photosynthetic production of oxygen and phosphorylation by chloroplasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 51, 1274.
69. ALLEN, S.F. 1975. A two step mechanism for the photosynthetic -

reduction of oxygen by ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 36.

70. TAGAWA, K., TSUJIMOTO, H.Y. y ARNON, D.I. 1963. Separation by monochromatic light of photosynthetic phosphorylation - from oxygen evolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, - 50, 544.
71. LOSADA, M. y PANEQUE, A. 1966. Light reduction of nitrate by chloroplasts depending on ferredoxin and NAD. *Biochim. - Biophys. Acta*, 126, 578.
72. BUCHANAN, B.B., KALBERER, P.P. y ARNON, D.I. 1967. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase in isolated chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 74.
73. BUCHANAN, B.B., SCHURMANN, P. y KALBERER, P.P. 1971. Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. *J. Biol. Chem.*, 246, 5952.
74. BUCHANAN, B.B. 1972. Ferredoxin-linked carboxylation reactions. - "The Enzymes" (P.D. Boyer Ed., Academic Press, New York-London) vol.VI, p. 193.
75. FORTI, G., MELANDRI, B.A., SAN PIETRO, A. y KE, B. 1970. Studies on the photoreduction of ferredoxin and the ferredoxin-NADP reductase flavoprotein by chloroplasts fragments: Effect of pyrophosphate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 140, 107.
76. BUCHANAN, B.B. y SCHURMANN, P. 1973. Regulation of ribulose-1-5-diphosphate carboxylase in the photosynthetic assimilation of carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*, 248, 4956.
77. BUCHANAN, B.B. y SCHURMANN, P. 1973. Ribulose-1,5-diphosphate - carboxylase: A regulatory enzyme in the photosynthetic assimilation of carbon dioxide. "Current Topics -



- in Cell Regulation" (B.L. Horecker y E.R. Stadman - Eds., Academic Press, New York-London), vol. 7, p. 1.
78. BLACK, C.C., FEWSON, C.A. y GIBBS, M. 1963. Photochemical reduction of triphosphopyridine nucleotide by cell-free extracts of blue-green algae. *Nature (London)*, 198, 88.
79. SMILLIE, R.M. 1965. Isolation of two proteins with chloroplast ferredoxin activity from a blue-green alga. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 20, 621.
80. YAMANAKA, T., TAKENAMI, S., WADA, K. y OKUNUKI, K. 1969. Purification and some properties of ferredoxin derived from the blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, 180, 196.
81. TANAKA, M., HANIU, M., YASUNOBU, K.T., RAO, K.K. y HALL, D.O. - 1975. Modification of the automated sequence determination as applied to the sequence determination of the *Spirulina maxima* ferredoxin. *Biochemistry*, 14, - 5535.
82. HALL, D.O., CAMMACK, R. y RAO, K.K. 1971. Role of ferredoxin in the origin of life and biological evolution. *Nature (London)*, 233, 136.
83. WADA, K., KAGAMIYAMA, H., SHIN, M. y MATSUBARA, H. 1974. Ferredoxin from a blue-green alga, *Aphanothece sacrum*. *J. Biochem.*, 76, 1217.
84. RAO, K.K., MATSUBARA, H., BUCHANAN, B.B. y EVANS, M.C.W. 1969. - Amino acid composition and terminal sequences of ferredoxins from two photosynthetic green bacteria. *J. Bacteriol.*, 100, 1411.
85. YAMANACA, T. y KAMEN, M.D. 1965. Purification of an NADP-reductase and of ferredoxin derived from the facultative photo

- toheterotroph, *Rhodopseudomonas palustris*. *Biochem. - Biophys. Res. Commun.*, 18, 611.
86. YOCH, D.C. y ARNON, D.I. 1972. Two biologically active ferredoxins from the aerobic nitrogen-fixing bacterium, *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.*, 247, 4514.
87. MORTENSON, L.E. 1964. Purification and analysis of ferredoxins from *Clostridium pasterianum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 81, 71.
88. MALKIN, R. y RABINOWITZ, J.C. 1966. The reconstitution of clostridial ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 822.
89. SOBEL, B.E. y LOVENBERG, W. 1966. Characteristics of *Clostridium pasterianum* in oxidation-reduction reactions. *Biochemistry*, 5, 6.
90. TANAKA, M.T., NAKASHIMA, A., BENSON, H., MOVER, H. y YASUNOBU, K.T. 1964. The amino acid sequence of *Clostridium pasterianum* ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 16, 422.
91. LOVENBERG, W., BUCHANAN, B.B. y RABINOWITZ, J.C. 1963. Studies on the chemical nature of clostridial ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 238, 3899.
92. WILDER, M., VALENTINE, R.C. y AKAGI, J.M. 1963. Ferredoxin of *Clostridium thermosaccharolyticum*. *J. Bacteriol.*, 86, 861.
93. STADTMAN, T.C. 1966. Glycine reduction to acetate and ammonia - identification of ferredoxin and another low-molecular-weight acidic protein as components of the reductase system. *Arch. Biochem. Biophys.*, 113, 9.

94. DYER, J.K. y ANDERSON, A.W. 1968. Isolation and role of nonheme iron protein in *Clostridium botulinum*. *Appl. Microbiol.* 16, 207.
95. TANAKA, M., HANIU, M., MATSUEDA, G., YASUNOBU, K.T., HIMES, R.H., AKAGI, J.M., BARNES, E.M. y DEVANATHAN, T. 1971. Primary structure of the *Clostridium tartarivorum* ferredoxin a heat-stable ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 246, 3953.
96. BUCHANAN, B.B. y RABINOWITZ, J.C. 1964. Some properties of *Methanobacterium femelianskii* ferredoxin. *J. Bacteriol.* - 88, 806.
97. LE GALL, J. y DRAGONI, N. 1966. Requirement of ferredoxin for the SO_3^{2-} reduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 145.
98. SUH, B. y AKAGY, J.M. 1966. Pyruvate-carbon dioxide reactions of *Desulfovibrio desulfuricans*. *J. Bacteriol.*, 91, - 2281.
99. TSUNODA, J.N., YASUNOBU, K.T. y WHITELEY, H.R. 1968. Nonheme iron proteins. IX. The amino acid sequence of ferredoxin from *Micrococcus aerogenans*. *J. Biol. Chem.*, 243, 6262.
100. GILLARD, R.D., MCKENZIE, E.D., MASON, R., MAYHEW, S.G., PEEL, J. L. y STANGROOM, J.E. 1965. Nature of the non-haem iron in ferredoxin and rubredoxin. *Nature (London)*, 208-769.
101. YOCH, D.C. y VALENTINE, R.C. 1972. Four-iron (sulfide) ferredoxin from *Bacillus polymixa*. *J. Bacteriol.*, 110, 1211.
102. SHETHNA, Y.I., STOMBAUGH, N.A. y BURRIS, R.H. 1971. Ferredoxin from *Bacillus polymixa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

42, 1108.

103. GEIWTZ, H.S. y VOLKER, W. 1962. A respiratory enzyme from *Chlorella*. *Z. Physiol. Chem.*, 330, 124.
104. MITSUI, A. 1971. Purification and some properties of crystalline *Euglena* ferredoxin. *Biochim. Biophys. Acta*, 243, - 447.
105. MATSUBARA, H. 1968. Purification and some properties of *Scenedesmus* ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 243, 370.
106. SUGENO, K. y MATSUBARA, H. 1969. Amino acid sequence of *Scenedesmus* ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 244, 2979.
107. BOGER, P. 1970. Ferredoxin aus *Bumilleriopsis filiformis* Vischer. *Pflanzl. Physiol.*, 92, 105.
108. WHATLEY, F.R., TAGAWA, K. y ARNON, D.I. 1963. Separation of the light and dark reactions in electron transfer during photosynthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 49, 226.
109. HALL, D.O., GIBSON, J.F. y WHATLEY, F.R. 1966. Electron spin resonance spectra of spinach ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 81.
110. CRAWFORD, C.G. y JENSEN, R.G. 1971. Isolation and partial characterization of ferredoxin from *Zea mays*. *Plant Physiol.*, 47, 447.
111. BENDALL, D.S., GREGORY, R.P.F. y HILL, R. 1963. Chloroplast ferredoxin from parsley. *Biochem. J.*, 88, 29.
112. HILL, R. y BENDALL, D.S. 1960. Crystallization of a Photosynthetic Reductase from a green plant. *Nature (London)*, - 187, 417.
113. FRY, K.T. y SAN PIETRO, A. 1962. Photosynthetic pyridine nucleotide reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 9, 218.

114. HILL, R. y BENDALL, F. 1960. Tomada de "Iron-Sulfur Proteins". (W. Lovenberg Ed., Academic Press, New York-London). Vol. II, p. 29.
115. NEWMAN, D.J., IHLE, J.N. y DURE, L. 1969. Chemical composition of a ferredoxin isolated from cotton. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 36, 947.
116. KERESZTES-NAGY, S. y MARGOLIASH, E. 1966. Preparation and characterization of alfalfa ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 241, 5955.
117. KERESZTES-NAGY, S., PERINE, F. y MARGOLIASH, E. 1969. Primary structure of alfalfa ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 244, 981.
118. BENSON, A.M. y YASUNOBU, K.T. 1969. Non-heme iron proteins. X. The amino acid sequence of ferredoxin from *Leucaena glauca*. *J. Biol. Chem.*, 244, 955.
119. SCHURMANN, P., BUCHANAN, B.B. y MATSUBARA, H. 1970. Ferredoxin from fern and amaranthus: Two diverse plants similar ferredoxins. *Biochem. Biophys. Acta*, 223, 450.
120. ZANOBINI, A., FIRENZUOLI, A.M., VANNI, P. y RAMPONI, G. 1970. Isolation and purification of *Pinus pinea* ferredoxin. *Physiol. Chem. Physics*, 2, 331.
121. RAO, K.K. 1969. Isolation and characterization of taro ferredoxin. *Phytochemistry*, 8, 1379.
122. AGGARWAL, S.J., RAO, K.K. y MATSUBARA, H. 1971. Horsetail ferredoxin: Isolation and some chemical studies. *J. Biochem.* 69, 601.
123. ZANOBINI, A., VANNI, P., MASTRONUZZI, A.M. y RAMPONI, G. 1967. Use of Tween 80 in ferredoxin extraction from Gymnosperms. *Phytochemistry*, 6, 1633.
124. GLICKSON, J.D., PHILLIPS, W.D., McDONALD, C.C. y POE, M. 1971.-

- P M R characterization of alfalfa and soybean ferredoxins: The existence of two ferredoxins in soybean. - Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 271.
125. LEE, S.S., TRAVIS, J. y BLACK, C.C. 1970. Characterization of ferredoxin from nutsedge, *Cyperus rotundus* and other species with a high photosynthetic capacity. Arch. Biochem. Biophys., 141, 676.
126. SHANMUGAM, K.T. y ARNON, D.I. 1971. Effect of ferredoxin on bacterial photophosphorylation. Fed. Proc. 30, 1136.
127. SHANMUGAM, K.T., BUCHANAN, B.B. y ARNON, D.I. 1972. Ferredoxine in light and dark-grown photosynthetic cells with special reference to *Rhodospirillum rubrum*. Biochim. Biophys. Acta, 256, 477.
128. YOCH, D.C. 1973. Purification and properties of two ferredoxins from the nitrogen-fixing bacterium. Arch. Biochem. Biophys., 158, 633.
129. MUKHIM, E.N., NEZNAICO, N.F., CHOCONOV, V.A. y EROKHIM, Y.E. - 1975. On two forms of stable ferredoxin from the leaves of *Pisum sativum*. Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 221, 228.
130. MALKIN, R. y BEARDEN, A.J. 1971. Primary reactions of photosynthesis: photo-reduction of a bound chloroplast ferredoxin at low temperature as detected by E P R spectroscopy. Proc. Nat. Acad. Sci. US, 68, 16.
131. BEARDEN, A.J. y MALKIN, R. 1972. Bound ferredoxin of chloroplast. Role of primary acceptor of photosystem I. Biochem. Biophys. Res. Commun., 46, 1299.
132. BEARDEN, A.J. y MALKIN, R. 1972. Bound ferredoxin of chloroplasts. Role as the primary electron acceptor of photosystem I. Biochim. Biophys. Acta, 283, 456.

133. BENSON, A.M., MOWER, H.F. y YASUNOBU, K.T. 1967. The amino acid sequence of clostridium butyricum ferredoxin. Arch. - Biochem. Biophys., 121, 563.
134. RALL, S.C., BOLINGER, R.E. y COLE, R.D. 1969. Amino acid sequence of ferredoxin from clostridium acidurici. Biochemistry, 8, 2486.
135. TRAVIS, J., NEWMAN, D.J., LE GALL, J. y PECK, H.D. 1971. Amino acid sequence of ferredoxin from the sulfatereducing bacterium Desulfovibrio gigas. Biochem. Biophys. Res. Commun., 45, 452.
136. MATSUBARA, H., SASAKI, R.M., TSUCHIYA, D.K. y EVANS, M.C.W. - 1970. Amino acid sequence of chromatium ferredoxin. - J. Biol. Chem., 245, 2121.
137. MATSUBARA, H. y SASAKI, R.M. 1968. Spinach ferredoxin. ii. Tryptic chymotryptic and thermolitic peptides and complete amino acid sequence. J. Biol. Chem., 243, 1732.
138. RAO, K.K. y MATSUBARA, H. 1970. Amino acid sequence of taro ferredoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38, 500.
139. KNIGHT, E. y HARDY, R.W.F. 1966. Isolation and characterization of ferredoxin from nitrogen-fixing clostridium pasteurianum. J. Biol. Chem., 241, 2752.
140. TANAKA, M., HANIU, M., YASUNOBU, K.T., MAYHEW, S.G. y MASSEY, V. 1971. Amino acid sequence of the Peptostreptococcus elsdeni flavodoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 886.
141. MATSUBARA, H., JUKES, T.H. y CANTOR, C.R. 1968. (Pub. 1969). - Structural and evolutionary relations of ferredoxins. U.S. At. Energy Comm. 1, 201.

142. STANIER, R.Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M. y COHEN-BAZIRE, G. - 1971. Tomada de: TANACA, M., HANJU, M., YASUNOBU, K. T., RAO, K.K. y HALL, D.O. 1975. "Modification of the automated sequence determination as applied to the sequence determination of the Spirulina maxima ferredoxin". Biochemistry, 14, 5535.
143. RAO, K.K., SMITH, R.V., CAMMACK, R., EVANS, M.C.W., HALL, D.O. y JOHNSON, C.E. 1972. Spectroscopic characterization of ferredoxin from the blue-green alga *Microcystis flos-aquae*. Biochem. J., 129, 1159.
144. CAMMACK, R., HALL, D.O. y RAO, K.K. 1971. Ferredoxins: are they living fossils?. New Sci. J., 51, 696.
145. LOSADA, M. y ARNON, D.I. 1964. Enzyme systems in photosynthesis. "Modern Methods of Plant Analysis" (K. Paech y M.V. Tracey Eds., Springer-Verlag, Berlin, Gottingen, Heidelberg), vol VII, p. 569.
146. ECK, R.V. y DAYHOFF, M.O. 1966. Evolution of the structure of ferredoxin based on living relics of primitive amino acid sequences. Science, 152, 363.
147. WHATLEY, F.R. y ARNON, D.I. 1963. Photosynthetic phosphorylation in plants. "Methods in Enzymology" (S.P. Colowick y N.O. Kaplan Eds., Academic Press, New York - London), vol VI, p. 308.
148. FOUST, G.D., MAYHEW, S.G. y MASSEY, V. 1969. Complex formation between ferredoxin-triphosphorydine nucleotide reductase and electron transfer proteins. J. Biol. Chem., 244, 964.
149. EVANS, M.C.W. 1968. Ferredoxin-dependent synthesis of o-ketoglutarate and pyruvate by extracts of the green pho-

- tosynthetic bacterium *Chloropseudomonas ethylicum*. -
Biochem. Biophys. Res. Commun., 33, 146.
150. ZUMFT, W.G. 1972. Ferredoxin: Nitrite oxidoreductase from *Chlorella*. Purification and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 276, 363.
151. SMILLIE, R.M. y ENTSCH, B. 1971. Phytoflavin. "Methods in Enzymology" (A. San Pietro Ed., Academic Press, New York-London), vol. XXIII, p. 504.
152. BORCHERT, M.T. y WESSELS, J.S.C. 1970. Combined preparation of ferredoxin, ferredoxin-NADP⁺ reductase and plastocyanin from spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, 197, 78.
153. LOWRY, H.O., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
154. ORNSTEIN, L. 1964. Disk electrophoresis. I. Background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 321.
155. DAVIS, B.J. 1964. Disk electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, 404.
156. BRILL, W.J., WETSPHAL, J., STIEGHORST, M., DAVIS, L.C. y SHAH, V.K. 1974. Detection of nitrogenase components and other nonheme iron proteins in polyacrylamide gels. - *Anal. Biochem.*, 60, 237.
157. WHATLEY, F.R., ALLEN, M.B. y ARNON, D.I. 1959. Photosynthesis - by isolated chloroplasts. VII. Vitamin K and riboflavin phosphate as cofactors of cyclic phosphorylations. *Biochim. Biophys. Acta*, 32, 32.
158. ARNON, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Poly-

- phenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1.
159. ZEPPEZAUER, M., EKLUND, H. y ZEPPEZAUER, D. 1968. Microdiffusion cell for the growth of single protein crystals by means of equilibrium dialysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 564.
160. VESTERBERG, O. y SVENSSON, H. 1966. Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobin. *Acta Chem. Scand.* 20, 820.
161. BEHNKE, J.N., DAGHER, S.M., MASSEY, T.H. y DEAL, W.C.Jr. 1975.- Rapid, multisample isoelectric focusing in sucrose density gradients using conventional polyacrylamide electrophoresis equipment: A two-peak transient in the approach-to-equilibrium. *Anal. Biochem.* 69, 1.
162. VETTER, H. y KNAPPE, J. 1971. Flavodoxin and ferredoxin of *Escherichia coli*. *Hoppe-seyler's Z. Phys. Chem.*, 352, - 433.
163. MARTIN, R.G. y AMES, B.N. 1961. A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures. *J. Biol. Chem.*, 236, 1372.
164. MOORE, S. 1963. The determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.*, 238, 235.
165. MOORE, S., SPACKMAN, D.H. y STEIN, W.H. 1958. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *Anal. Chem.*, 30, 1185.
166. PERKIN ELMER. 1971. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. Ed. The Perkin Elmer Corp. USA.
167. FOGO, J.K. y POPOWSKY, M. 1949. Spectrophotometric determination

- of hydrogen sulfide. Methylene blue methods. Anal. - Chem. 21, 732.
168. BOYER, P.D. 1954. Spectrophotometric study of the reaction of protein sulphhydryl groups with organic mercurials. J. Am. Chem. Soc., 76, 4331.
169. BROCKLEHURST, K., CARLSSON, J., KIERSTAN, M.P.J. 1973. Covalent chromatography. Preparation of fully active papain - from dried papaya latex. Biochem. J. 133, 573.
170. CARLSSON, J., AXEN, R., BROCKLEHURST, K. 1974. Immobilization - of urease by thiol-disulphide interchange with concomitant purification. Eur. J. Biochem., 44, 189.
171. CARLSSON, J. y SVENSSON, A. 1974. Preparation of bovine mercaptalbumin by means of covalent chromatography. FEBS - Lett., 42, 183.
172. LOSADA, M. y PANEQUE, A. 1971. Nitrite reductase. "Methods in - Enzymology". vol. XXIII, A, p. 487 (A. San Pietro Ed. Academic Press, New York-London)., vol. XXIII, A, p.- 487.
173. SNELL, F.D. y SNELL, C. 1949. "Colorimetric methods of analysis" (D. van Nostrand Co. Ed., New York), 3rd. ed., vol. II.
174. FISKE, C.H. y SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 66, 375.
175. BUCHANAN, B.B. 1975. Ferredoxin-activated fructose-1,6-diphosphatase system of spinach chloroplasts. "Methods in Enzymology" (W.A. Wood, Ed., Academic Press, New York-London), vol. XLII, C, p. 397.
176. LAZARO, J.J., CHUECA, A., LOPEZ GORGE, J. y MAYOR, F. 1974. - Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloroplasts. Purification and heterogeneity. Phytochem. 13,

177. RACKER, E. y SCHROEDER, E.A.R. 1958. Reductive pentose phosphate cycle. II. Specific C-1 P phosphatases for fructose-1,6-disphosphatase and sedoheptulose-1,7-diphosphatase. Arch. Biochem. Biophys. 74, 326.
178. PREISS, J., BIGGS, M.L. y GREENBERG, E. 1967. The effect of magnesium ion concentration on the pH optimum of the spinach leaf alkaline fructose disphosphatase. J. Biol. Chem. 242, 2292.
179. CHUECA, A., LAZARO, J.J., LOPEZ GORGE, J. y MAYOR, F. 1975. Fructosa-1,6-difosfatasa de cloroplastos de hojas de espinaca. Purificación del factor proteico ligado a dicha actividad. Anal. Edaf. y Agrobiol. 34, 541.
180. HALL, D.O., RAO, K.K. y CAMMACK, R. 1972. Stable and easily extractable plant-type ferredoxin from the blue green alga *Spirulina maxima*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 798.
181. MITSUI, A. y ARNON, D.I. 1971. Tomada de: BUCHANAN, B.B. y ARNON, D.I. 1971. "Ferredoxins from photosynthetic bacteria, algae, and higher plants". "Methods in Enzymology" . (A. San Pietro Ed., Academic Press, New York-London), vol. XXIII, p. 413.
182. NAYHEW, S.G. 1971. Nondenaturing procedure for rapid preparation of ferredoxin from *Clostridium pasterianum*. Anal. Biochem., 42, 191.
183. KATOH, S. y TAKAMIYA, A. 1963. The iron-binding in photosynthetic pyridine nucleotide reductase. Arch. Biochem. Biophys., 102, 189.
184. SIEDOW, J.N. y SAN PIETRO, A. 1974. Studies on Photosystem I. -

Characteristic of "310 material" isolated from spinach chloroplasts. Arch. Biochem. Biophys., 164, 145.

185. HASLETT, B.G., CAMMACK, R. y WHATLEY, F.R. 1973. Quantitative studies on ferredoxin in greening bean leaves. Biochem. J. 136, 697.
186. MATSON, R.S. y KIMURA, T. 1975. Immunological quantitation of chloroplast ferredoxin. Biochim. Biophys. Acta, 396, 293.
187. BLACK, C.C. y MAYNE, B.C. 1970. P₇₀₀ activity and chlorophyll content of plants with different photosynthetic carbon dioxide fixation cycles. Plant Physiol., 45, 738.
188. TAGAWA, K. y ARNON, D.I. 1968. Oxidation-reduction potential and stoichiometry of electron transfer in ferredoxins. Biochim. Biophys. Acta, 153, 602.
189. MALKIN, R. y RABINOWITZ, S.C. 1967. The reactivity of clostridial ferredoxin with iron chelating agents and 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid. Biochemistry, 6, 3880.
190. CAMMACK, R. 1975. Effects of solvent on the properties of ferredoxins. Biochem. Soc. Transactions, 3, 482.
191. HALL, D.O., CAMMACK, R. y RAO, K.K. 1973. Plant ferredoxins and their relation to the evolution of ferredoxins from primitive life. Pure Appl. Chem., 34, 553.
192. CAMMACK, R., RAO, K.K. y HALL, D.O. 1971. Effects of chaotropic agents on the spectroscopic properties of spinach ferredoxin. Biochem. Biophys. Res. Commun., 44, 8.
193. EVANS, M.C.W. y BUCHANAN, B.B. 1965. Photoreduction of ferredoxin and its use in CO₂ fixation by a subcellular system from a photosynthetic bacterium. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 53, 1420.

194. WILDER, M., VALENTINE, R.C. y AKAGI, J.M. 1963. Ferredoxin of *Clostridium thermosaccharolyticum*. *J. Bacteriol.*, 86, 861.
195. GERSONDE, K., TRITTELVITZ, E., SCHLAAK, H.E. y STABEL, H.H. 1971. Influence of dimerization on the active center in ferredoxin from *Clostridium pasterianum*. *Eur. J. Biochem.* 22, 57.
196. APELLA, E. y SAN PIETRO, A. 1961. Physical properties of photosynthetic pyridine nucleotide reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6, 349.
197. FRY, K.T., LAZARINI, R.A. y SAN PIETRO, A. 1963. The photoreduction of Fe in photosynthetic pyridine nucleotide reductase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 50, 652.
198. HORIO, T. y SAN PIETRO, A. 1964. Action spectrum for ferricyanide photoreduction and redox potential of chlorophyll 683. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 51, 1226.
199. EVANS, M.C.W., HALL, D.O., BOTHE, H. y WHATLEY, F.R. 1968. Stoichiometry of electron transfer by bacterial and plant ferredoxins. *Biochem. J.*, 110, 485.
200. ORME-JOHNSON, W.H. y BEINERT, H. 1969. Reductive titration of iron-sulfur proteins containing two or four iron atoms. *J. Biol. Chem.* 244, 6143.
201. PALMER, G. 1973. Current insights into the active center of spinach ferredoxin and other iron-sulfur proteins. "Iron-sulfur Proteins". (W. Lovenberg Ed., Academic Press, New York-London), vol. II, p. 285.
202. BLACK, C.C. 1966. Chloroplasts reactions with dipyridyl salts. *Biochim. Biophys. Acta*, 120, 332.
203. YOCUM, C.F. y SAN PIETRO, A. 1970. Ferredoxine-reducing subs-

- tance (FRS) from spinach. II. Separation and assay. - Arch. Biochem. Biophys., 140, 152.
204. TSUJIMOTO, H.Y., CHAIN, R.K. y ARNON, D.I. 1973. Photoreduction of ferredoxin-NADP in the presence and absence of ferredoxin-reducing substance (FRS). Biochem. Biophys. Res. Commun., 51, 917.
205. EVANS, M.C.W., TELFER, A., y LORD, A.V. 1972. Evidence for the role of a bound ferredoxin as the primary electron acceptor of photosystem I in spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta, 267, 530.
206. MALKIN, R., APARICIO, P.J. y ARNON, D.I. 1974. The isolation and characterization of a new iron-sulfur protein from photosynthetic membranes. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 71, 2362.
207. EVANS, M.C.W. y CAMMACK, R. 1975. The effect of the redox state of the bound iron-sulfur centers in spinach chloroplasts on the reversibility of P700 photooxidation at low temperatures. Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 187.
208. ORME-JOHNSON, W.H. y BEINERT, H. 1969. Heterogeneity of paramagnetic species in two iron-sulfur proteins: Clostridium pasterianum ferredoxin and milk xanthine oxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36, 337.
209. EISENSTEIN, K.K. y WANG, J.H. 1969. Conversion of light to chemical free energy. I. Porphyrin-sensitized photoreduction of ferredoxin by glutathione. J. Biol. Chem., 244, 1720.
210. FORTI, G., MELANDRI, B.A., SAN PIETRO, A. y KE, B. 1970. Photoreduction of ferredoxin and the ferredoxin NADP reductase flavoprotein by chloroplasts fragments: effect of pyrophosphate. Arch. Biochem. Biophys., 140, 107.

211. SWEENEY, W., YOCH, D. y RABINOWITZ, J. 1975. High and low reduction potential 4Fe-4S clusters in *Azotobacter vinelandii* (4Fe-4S)₂ ferredoxin. I. Influence of the polypeptide on the reduction potentials. *J. Biol. Chem.*, 250, 7842.
212. ADMAN, E.T., SIEKER, L.C. y JENSEN, L.H. 1973. Structure of bacterial ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 248, 3987.
213. CARTER, C.W., KRAUNT, J., FREER, S.T., ALDEN, R.A., SIEKER, L.C., ADMAN, E. y JENSEN, L.H. 1972. Comparison of FeS₄* clusters in high-potential iron protein and in ferredoxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 69, 3526.
214. HOWARD, J.B., LORSBACH, T. y QUE, L. 1976. Iron-sulfur clusters and cystein distribution in a ferredoxin from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, - 70, 582.
215. PALENS, S. y PAUL, K.G. 1963. Mammalian cytochrome c. "The Enzymes" (P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrbrack Eds., Academic Press, New York-London), vol. VIII, p. 97.
216. PALMER, G., SANDS, R.H. y MORTENSON, L.E. 1966. Electron paramagnetic resonance studies on the ferredoxin from *Clostridium pasterianum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 357.
217. MALKIN, R. y RABINOWITZ, J.C. 1966. The chemistry of clostridial ferredoxin. *Biochemistry*, 5, 1262.
218. SASAKI, R.M. y MATSUBARA, H. 1967. Molecular weight and amino acid composition of *Chromatium* ferredoxin. *Biochem.-Biophys. Res. Commun.*, 28, 467.
219. HONG, J.S. y RABINOWITZ, J.C. 1970. Effect of chemical modifications on the reconstitution, activity and stability

- of clostridial ferredoxin. J. Biol. Chem., 245, 4988.
220. BUCHANAN, B.B., LOVENBERG, W. y RABINOWITZ, J.C. 1963. A comparison of clostridial ferredoxins. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 49, 345.
221. BLOMSTROM, D.C., KNIGHT, E., PHILLIPS, W.D. y WEIHER, S.F. 1964. The nature of Fe in ferredoxin. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 51, 1085.
222. DUNHAM, W.R., BEARDEN, A.J., SALMEEN, I.T., PALMER, G., SANDS, R.H., ORME-JOHNSON, W.H. y BEINERT, H. 1971. Electronic properties of two-iron, two-sulphur proteins. II. Two-iron ferredoxins in spinach, parsley, pig adrenal cortex, Azotobacter vinelandii, and Clostridium pasteurianum. Magnetic field Moessbauer spectroscopy. - Biochim. Biophys. Acta, 253, 134.
223. BRITZINGER, H., PALMER, G. y SANDS, R.H. 1966. The ligand field of Fe in ferredoxin from spinach chloroplasts and related nonheme Fe enzymes. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 55, 397.
224. PETERING, D.H. y PALMER, G. 1970. Properties of spinach ferredoxin in anaerobic urea solution: a comparison with the native protein. Arch. Biochem. Biophys. 141, 456.
225. BAYER, E. y JOSEF, D. 1970. Structure of plant ferredoxin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 351, 537.
226. QUE, L., HOLM, R. y MORTENSON, L. 1975. Extrusion of Fe_2S_2 and Fe_4S_4 cores from the active sites of ferredoxin proteins. J. Am. Chem. Soc., 97, 463.
227. PETERING, D., FEE, J.A. y PALMER, G. 1971. Tomada de: PALMER, G. 1973. Current insights into the active center of spinach ferredoxin and other iron-sulfur proteins. "Iron

- Sulfur Proteins" (W. Lovenberg Ed., Academic Press, New York-London); vol. 11, p. 285.
228. BAYER, E., JOSEF, D., KRAUS, P., HAGENMAIER, H., ROEDER, A., y TREBST, A. 1967. Degradation and synthesis of active centers of plant ferredoxin. *Biochim. Biophys. Acta*, 143, 435.
229. HONG, J.S. y RABINOWITZ, J.C. 1970. All-or-none mode of the reconstitution and the reactions of o - o - bipyridyl and mercuricals with clostridial ferredoxin. *J. Biol. Chem.*, 245, 6574.
230. LAZARO, J.J., CHUECA, A., LOPEZ GORGE, J. y MAYOR, F. 1975. Properties of spinach chloroplasts fructose-1,6-diphosphatase. *Phytochemistry*, 14, 2579.
231. HELDT, H.W., WERDAM, K., MILO-VANCEV, M. y GELLER, G. 1973. Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space. - 1973. *Biochim. Biophys. Acta*, 314, 224.
232. KELLY, G.I., ZIMMERMANN, G. y LATZKO, E. 1976. Light induced activation of fructose-1,6-diphosphatase in isolated intact chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70, 193.
233. BAIER, D. y LATZKO, E. 1975. Properties and regulation of C-1-fructose-1,6-diphosphatase from spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 396, 141.
234. EL-BADRY, A.M. 1974. Hexosediphosphatase from spinach chloroplasts: purification, crystallization and some properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 333, 366.
235. LAZARO, J.J., CHUECA, A., LOPEZ GORGE, J. y MAYOR, F. 1975. Fructose-1,6-diphosphatase from spinach leaf chloro-

plasts: Molecular weight transitions of the purified enzyme. *Plant Science Letters*, 5, 49.

236. CHUECA, A., LAZARO, J.J. y LOPEZ GORGE, J. Fructose-1,6-diphosphate from spinach leaf chloroplasts: Subunit structure. *Plant Science Letters* (en prensa).
237. BRASSHAM, J.A. 1971. Photosynthetic carbon metabolism. *Proc. - Nat. Acad. Sci. U.S.*, 68, 2877.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053027