

**Desarrollo de la metodología para cuantificar la actividad de OCT,
arginasa y arginina deaminasa en las células de *Nostoc* PCC 73101.**

**Memoria que presenta Antera Martel Quintana
para obtener la suficiencia investigadora**

28 de Mayo de 1993

1. INTRODUCCION

Cianobacterias fijadoras de nitrógeno del género *Nostoc* forman asociaciones simbióticas en las raíces de plantas terrestres (Lindblad 1990, Lindblad & Bergman 1989), en las que los compuestos nitrogenados (fundamentalmente citrulina y glutamina) son transferidos a la planta y la cianobacteria recibe diversos compuestos carbonados (Pate et al. 1988). Los estudios realizados con cianobacterias de vida libre han puesto de manifiesto que la citrulina es el principal producto de la fijación fotosintética de CO₂ (Linko et al. 1975, Holm-Hansen & Brown 1963, Lindblad et al. 1991), y han demostrado la presencia de carbamil fosfato sintetasa (CPS) y/o ornitín carbamil transferasa (OCT) (Bogges & Nylor 1975, Lawrie 1979, Carr 1983, Chen et al. 1987, Lindblad 1992).

El N₂ atmosférico es fijado en forma de amonio (Postage 1987, Sprent & Sprent 1990, Fay 1992, Lindblad & Guerrero 1993) y posteriormente incorporado a compuestos aminados. El exceso de nitrógeno puede ser almacenado como cianoficina, un copolímero de aspartato y arginina (Simon 1976, Allen 1988). La ruta metabólica desde glutamina a cianoficina se detalla en la Figura 1.

El metabolismo de la cianoficina está regulado por la cianoficinasasa (generando arginina y aspartato) (Gupta & Carr 1981 a, b; Carr 1983, Mackerras et al. 1990 a, b) y su anabolismo por la arginina-aspartato sintetasa. La arginina es posteriormente transformada en ornitina y urea por la aginasa, mientras la arginina deaminasa cataliza la conversión directa de la arginina en citrulina (Fig. 1) (Carr & Hood 1971, Weathers et al. 1978, Carr 1983, Lehninger 1982, Schubert & Boland 1990).

A pesar de la importancia de ésta ruta metabólica, no existen datos, ni metodologías estandarizadas para la medición de la actividad enzimática de estas enzimas en cianobacterias.

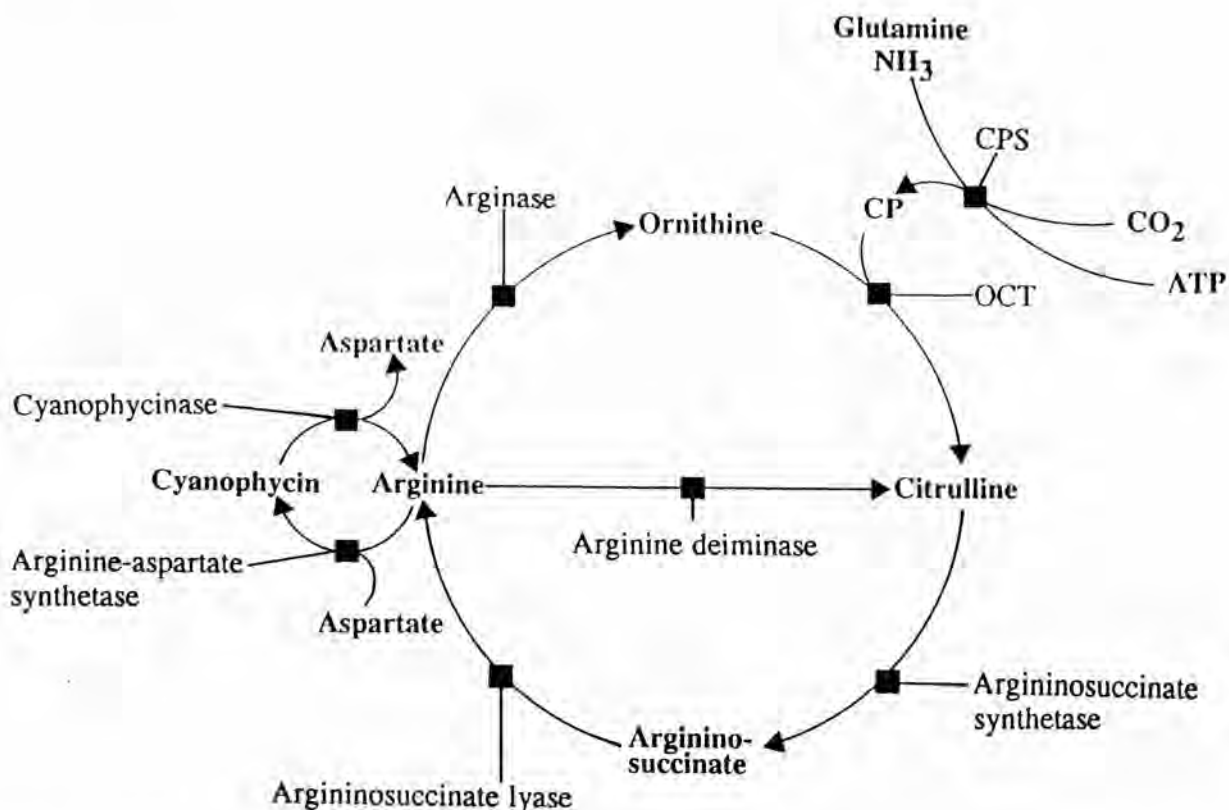


Figura 1. Representación del ciclo de la ornitina en cianobacterias capaces de formar gránulos de cianoficina.

CP: carbamil fosfato, CPS: carbamil fosfato sintetasa, OCT: ornitina carbamil transferasa.

2. OBJETIVO

Uno de los objetivos del trabajo experimental conducente a la obtención del grado de doctora ha sido el desarrollo de una metodología que permita la cuantificación de la actividad de OCT (EC 2.1.3.3), arginasa (EC 3.5.3.1) y arginina deaminasa (EC 3.5.3.6) en las células de *Nostoc* PCC 73102, con la finalidad de caracterizar el metabolismo esencial de la simbiosis.

3. MATERIAL

La estirpe *Nostoc* sp. PCC 73102 es una cianobacteria de vida libre, originariamente aislada de las raíces de la cicadácea *Macrozamia*. La cepa se obtuvo de la Colección de Cultivos Pasteur (PCC), Paris, Francia (Rippka et al. 1979) (Fig. 2). *Nostoc* PCC 73102 es la estirpe referencia del género *Nostoc* en la clasificación de la PCC. Es un organismo fotoheterótrofo facultativo capaz de usar glucosa, fructosa y/o ribosa como fuente(s) de carbono (Rippka et al. 1979).

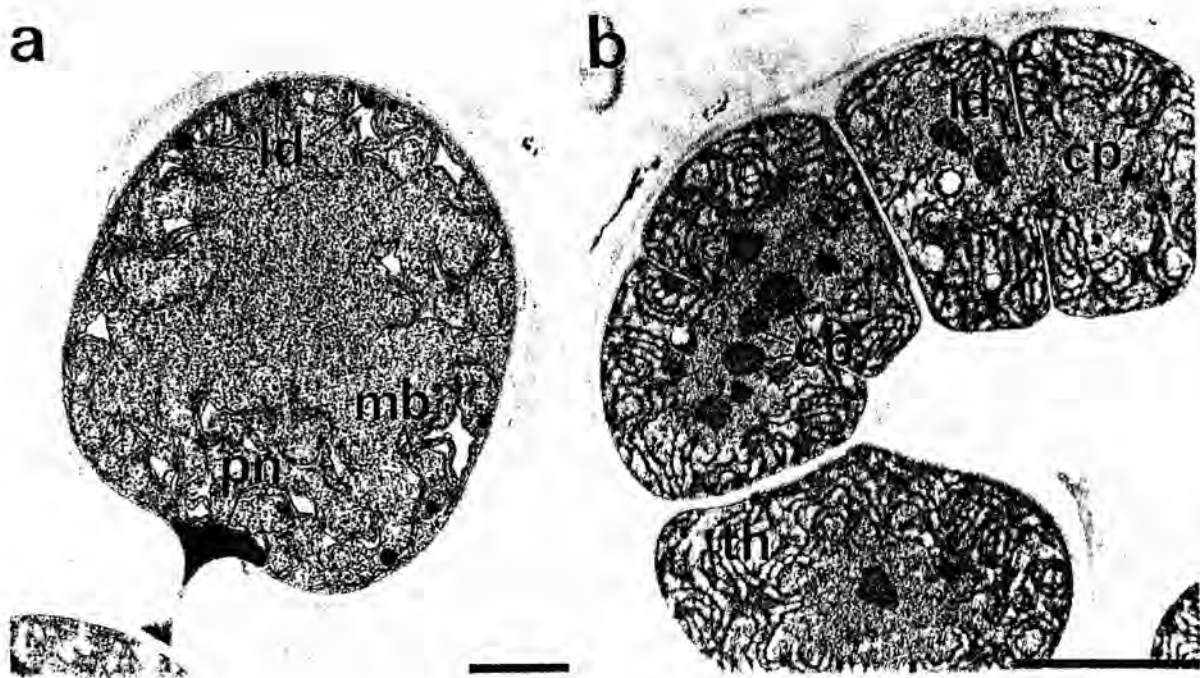


Figura 2. Micrografías al microscopio de transmisión electrónica de *Nostoc* PCC 73102 creciendo en medio BG11. (a) Heterociste. Se observan los nódulos polares (pn), las membranas (mb) y gotas lipídicas (ld). (b) Parte del filamento con varias células vegetativas. El centroplasma (cp), donde se localizan los carboxisomas (cb), está rodeado de tilacoides (th). Barras = 1 μ m.

Las células de *Nostoc* PCC 73102 se cultivaron en la luz y en oscuridad en medio BG11₀ (medio carente de nitrógeno; Stanier et al. 1971). Por medio de la adición de los azúcares glucosa y fructosa, y de los compuestos aminados arginina, ornitina o citrulina se simuló la simbiosis.

4. METODOLOGIA

Las actividades *in vitro* se determinaron mediante métodos colorimétricos. Los 3 protocolos que se desarrollaron partieron de la metodologías descritas por Boyde & Rahamatullah (1980) y Archibald (1944) para determinar ornitina carbamil transferasa (OCT) y arginasa en plasma sanguíneo. La actividad *in vitro* de arginina deaminasa se determinó combinando los métodos desarrollados para medir OCT y arginasa en cianobacterias.

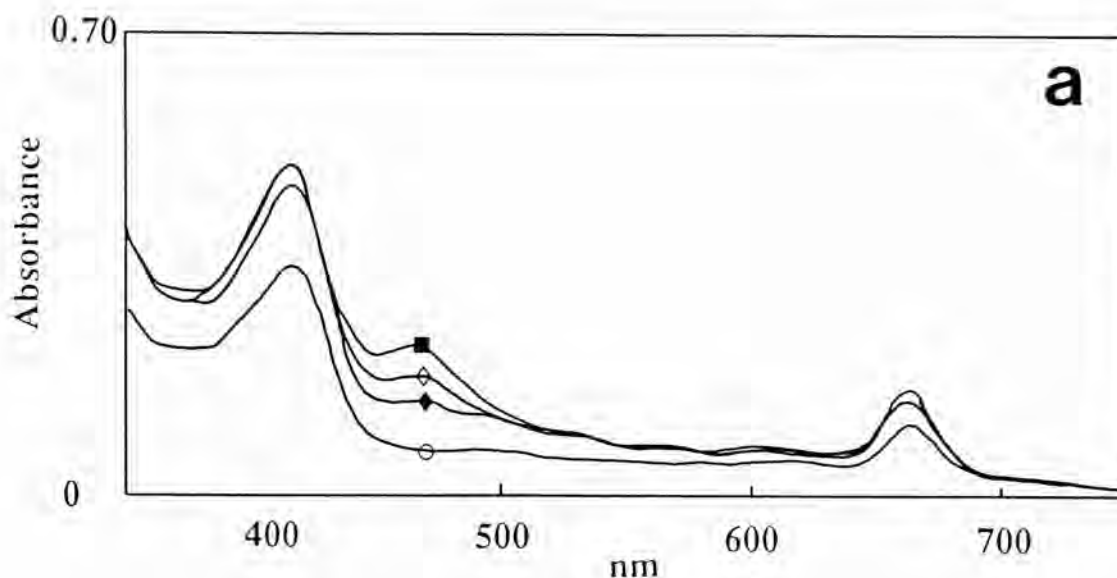
4.1. Desarrollo del método para cuantificar actividad OCT

Este método se basó en la determinación colorimétrica de citrulina utilizando diacetil monoxime (DAMO, nombre sistemático: 2,3-butanedione monoxime). Las células se recolectaron (3000 xg, 10 min), y homogeneizaron con ultrasonidos (MSE, Ultrasonic Power unit #12-63, Gran Bretaña) en un tampón [Tris-HCl (200 mM) (pH 8.5) conteniendo ditiotretiol (2 mM)] y se centrifugaron (14000 xg, 30 min, 4°C) para recoger el sobrenadante. La mezcla de la reacción enzimática consistió en HEPES-NaOH (200 mM) (pH 8.5), L-ornitina (10 mM) y carbamifosfato (10 mM) (CP) en un volumen final de 0.1 ml. La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 15 min y se detuvo añadiendo 100 µl de ácido tricloroacético (10%), recogiendo el sobrenadante tras centrifugar (14000

centrifugar (14000 xg ,5 min). El control consistió en la mezcla sin la adición de CP. La solución resultante se combinó con 400 μ l de una mezcla de ácido férrico (1N H₃PO₄ , 9N H₂SO₄ y 5 mM sulfato férrico de amonio) y 200 μ l de una solución de DAMO (50 mM), y antipirina (20 mM) (2,3-dimetil-1-fenil-3-pirazolin) añadida justo antes de ser usada). Las muestras se agitaron en un agitador de tubos (KEBO-Lab REAX 2000), se incubaron a 100°C durante 30 min, y se dejaron enfriar antes de medir la absorbancia a 464 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2000. Las actividades *in vitro* se calcularon utilizando un curva de calibración estándar lineal entre 0 y 0.25 μ mol de citrulina.

Para medir la actividad *in vitro* de OCT en los extractos y aumentar la sensibilidad del método se realizaron los siguientes pasos:

A.- Se localizó el pico de absorbancia (464 nm) del complejo citrulina/DAMO en los extractos añadiendo diferentes cantidades de citrulina (Fig. 3a) o del enzima OCT (Fig. 3b).



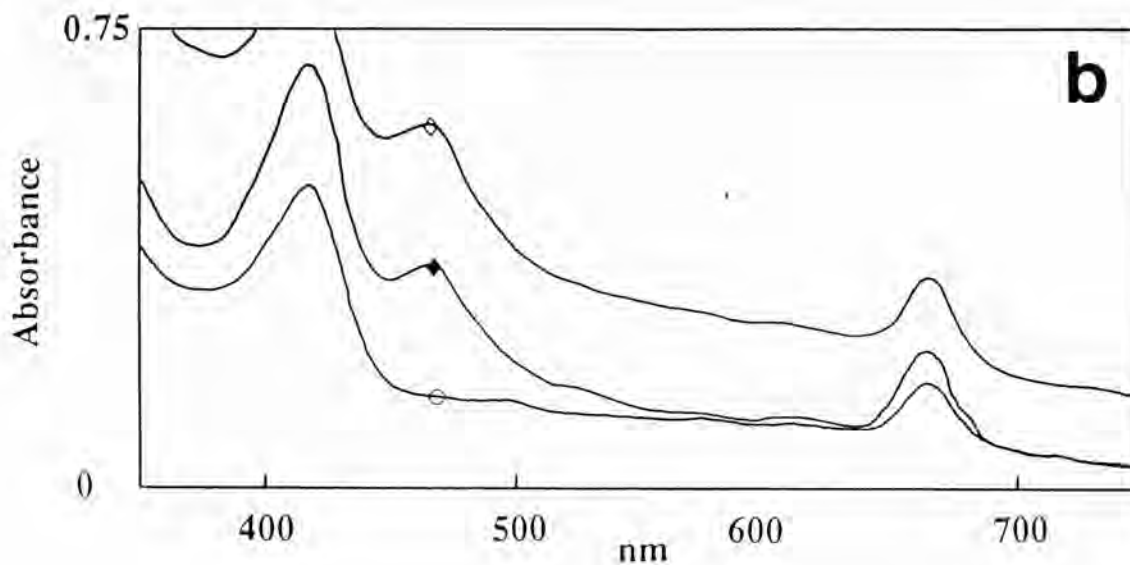


Figura 3. Localización del pico de máxima absorbancia del complejo citrulina/DAMO (a y b) añadiendo diferentes concentraciones de citrulina (a) ($0.125 \mu\text{mol}$, \blacklozenge ; $0.25 \mu\text{mol}$, \diamond ; $0.3 \mu\text{mol}$, \blacksquare) y de OCT (b) (20%, \circ ; 80%, \bullet). Un extracto crudo fue utilizado como control (\circ).

B.- Se aumentó el tiempo de incubación de citrulina con DAMO de 5 a 30 min (Fig. 4)

C.- Se disminuyó el volumen del reactivo cromogénico de 3 ml a $600 \mu\text{l}$, combinándolo con $200 \mu\text{l}$ de la muestra ($70 \mu\text{l}$ extracto crudo, $30 \mu\text{l}$ de mezcla reactiva, y $100 \mu\text{l}$ de ácido tricloroacético).

D.- Se ensayaron diferentes controles eliminando en cada uno de ellos uno de los compuesto que formaban la mezcla reactiva. La muestra en la que no se añadió el reactivo CP mostró los niveles más bajos de actividad.

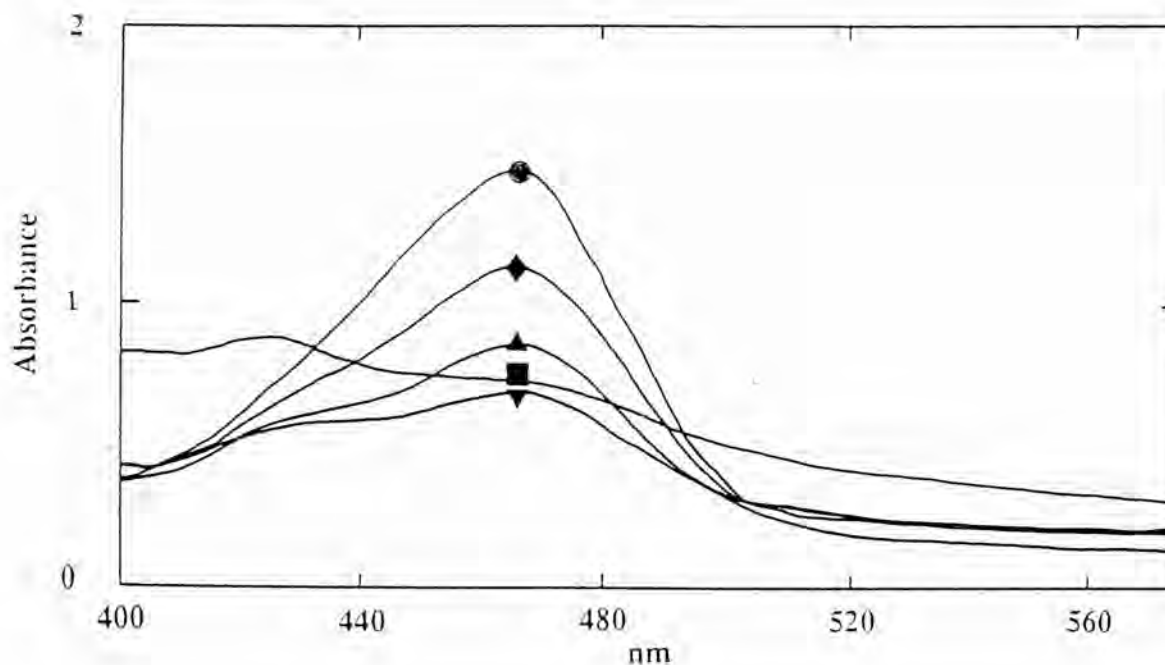


Figura 5. Variación de la sensibilidad en la determinación de citrulina en función del tiempo de incubación con DAMO. Una solución que contenía 1 μmol de citrulina se incubó durante 5 (■), 10 (▼), 15 (▲), 20 (◆) y 30 (●) min junto con 400 μl de solución de ácido férrico y 200 μl de solución de DAMO, antes de medir la absorbancia a 464 nm.

La actividad *in vitro* de la enzima OCT también se determinó empleando la técnica de tinción en geles de poliacrilamida.

Las células de *Nostoc* PCC 73102 se recolectaron mediante centrifugación (2500 $\times g$, 10 min) y se resuspendieron en un tampón [HEPES-NaOH (10 mM), Triton X-100 0.5% (v/v), ditiotreitól (2 mM) (pH 7.4)]. Las células fueron homogeneizadas (ultrasonidos) y centrifugadas (13000 $\times g$, 4°C, 10 min), recolectándose el sobrenadante. La electroforesis de los extractos crudos se realizó en geles de acrilamida de 10-15% de gradiente empleando un PhastSystem (Pharmacia Biotechnology Ltd., Uppsala, Suecia) (Lindblad 1992). La tinción de la enzima OCT se llevó a cabo siguiendo el método de

Farkas et al. (1987). El gel se incubó en una mezcla que contenía los sustratos para OCT [ornitina (5 mM) y CP (15 mM) en trietanolamina (270 mM) (pH 7.7)] durante 10 min a 37°C. La actividad de la OCT, produjo citrulina y fosfato inorgánico. El fosfato reaccionó con una mezcla de ácido nítrico y molibdato amónico (40 mM) en proporción 1:1, para formar ácido fosfomolibdico. En el último paso se redujo el ácido fosfomolibdico usando ácido ascórbico (10%). La enzima OCT se detectó como una banda azul. El peso molecular se determinó empleando marcadores de alto peso molecular de Pharmacia.

Para descartar la posible interferencia de aspartato carbamil transferasa (ATC, EC 2.1.3.2) (que da la misma respuesta que OCT), se reemplazó la ornitina por ácido aspártico en la mezcla reactiva. No se detectó actividad ATC alguna, lo que demostró que el método desarrollado es específico para OCT.

4.2. Desarrollo del método para cuantificar actividad arginasa y arginina deaminasa

La homogeneización de las células de *Nostoc* PCC 73102 (ver arriba) se realizó en un tampón de fosfato potásico (10 mM) (pH 8.0). El sobrenadante, obtenido después de centrifugar (14000 xg, 4°C, 1h), se utilizó para realizar los ensayos *in vitro*. La mezcla contenía EPPS (200 mM) [N-(2-hidroxietil) piperazine-N'-(ácido 3-propano sulfónico), pH 8.5], L-arginina (60 mM), y MnCl₂ (3 mM) en un volumen final de 600 µl. La reacción se llevo a cabo a 30°C durante 30 min. La reacción se detuvo añadiendo 20 µl de H₂SO₄ (2N). Los sobrenadantes se recolectaron después de centrifugar durante 5 min. Una muestra de la que se eliminó la arginina fue utilizada como control. La mezcla se empleó en la determinación de las actividades arginasa y arginina deaminasa.

El método para la determinación de actividad arginasa está basado en la detección colorimétrica de urea usando α -isonitrosufenone (INP). 500 μ l de la mezcla acidificada se combinaron con 536 μ l de una solución ácida de fosfato-sulfúrico (H_3PO_4 , H_2SO_4 concentrados y H_2O destilada en una relación 3:1:1) y 43 μ l de una solución de INP (4 gr de INP en 100 ml de 100% etanol). Las muestras se incubaron a 100°C durante una hora. Los tubos se dejaron enfriar a temperatura ambiente (aproximadamente 15 min) antes de medir la absorbancia a 540 nm. La actividad arginasa se calculó usando una curva de calibración lineal entre 0 y 1 μ mol de urea.

Para medir la actividad arginasa de los extractos y aumentar la sensibilidad del método se efectuaron los siguientes pasos y modificaciones de métodos:

A.- Se localizó el pico de absorbancia (540 nm) de urea/INP en los extractos añadiendo diferentes cantidades de urea (Fig. 5).

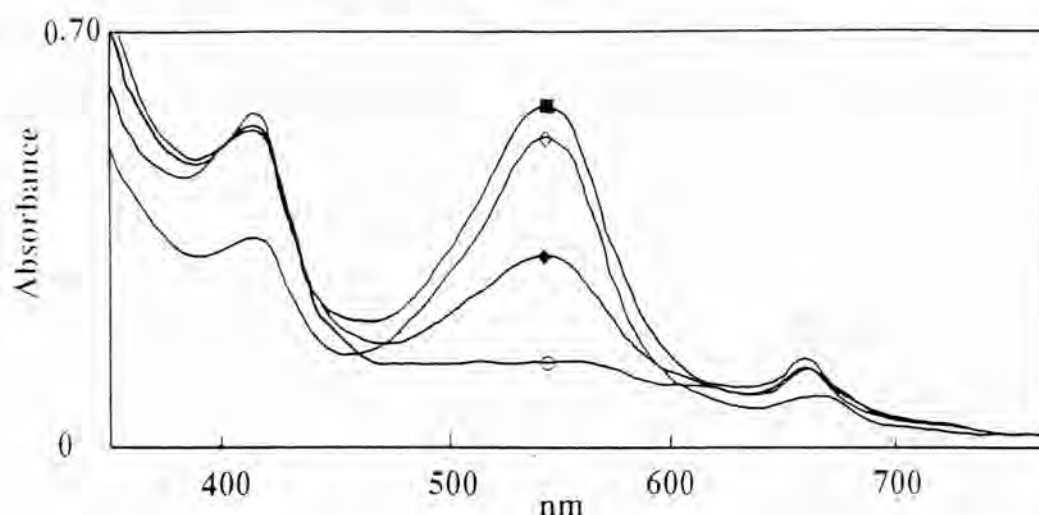


Figura 7. Localización del pico de máxima absorbancia del complejo urea/INP añadiendo diferentes concentraciones de urea (a) (0.25 μ mol, \blacktriangledown ; 0.50 μ mol, \blacktriangle ; 1.0 μ mol, \blacksquare). Un extracto crudo fue utilizado como control (\circ).

B.- Se aumentó el tiempo de centrifugación de la muestra a 1 hora a 14000 xg (Fig.6)

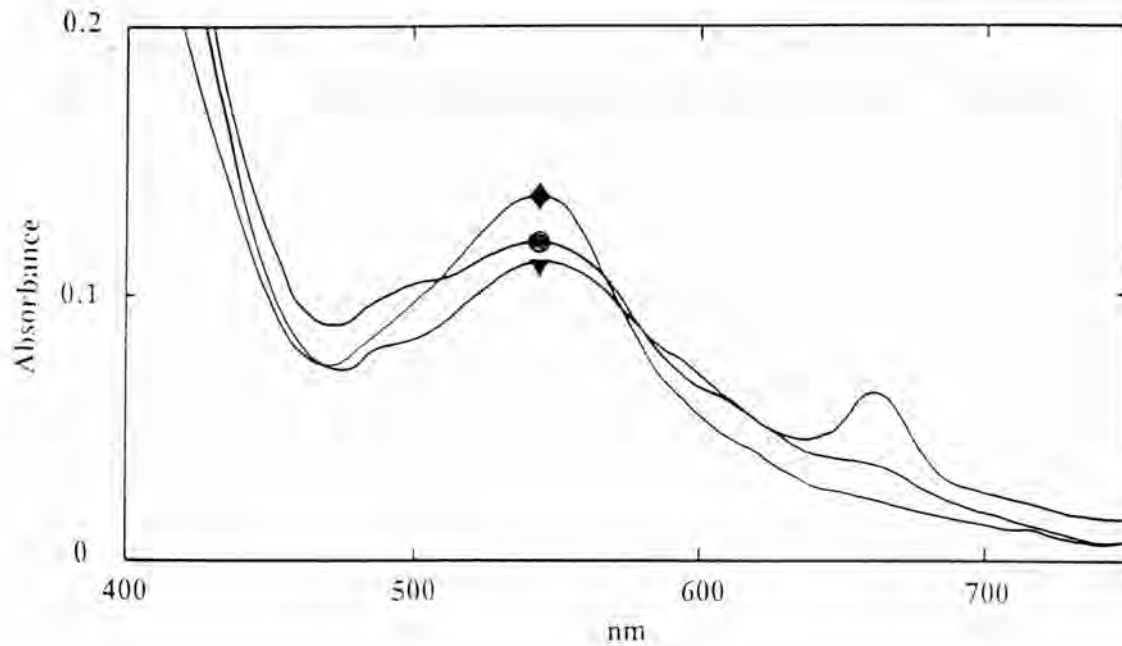


Figura 8. Fluctuación de la sensibilidad en la detección de urea en función del tiempo de centrifugación de los extractos (40 min, ▾; 60 min, ●; 75 min, ◆) antes de ser utilizados en los ensayos para la determinación de la actividad arginasa.

C.- se aumentó la concentración de arginina en la mezcla (de 30 a 60 mM).

D.- Se ensayaron diferentes controles, encontrándose los niveles más bajos de actividad en la muestra donde se había suprimido la arginina.

La actividad *in vitro* de la arginina deaminasa se determinó mediante la detección colorimétrica de citrulina. 100 μ l de la mezcla acidificada se mezclaron con DAMO siguiendo el protocolo descrito para determinar la actividad en OCT.

5. REFERENCIAS

- Allen MM (1968) Inclusions: Cyanophycin. *En: Packer L. & Glazer A.N. [Eds] Methods in Enzymology, vol. 167, Cyanobacteria.* Academic Press, San Diego, pp 207-213.
- Archibald RM (1944) Colorimetric determination of urea. *J. Biol. Chem.* 157:507-518.
- Bogges SF, Naylor J (1975) Partial purification and properties of ornithine transcarbamylase from *Nostoc muscorum* Kützing. *Plant Physiol.* 56:640-644
- Boyde TRC and Rahmatullah M (1980) Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Analytical Biochemistry* 107:424-431.
- Carr NG (1983) Biochemical aspects of heterocyst differentiation and function. *En: Papageorgiou GC, Packer L [Eds] Photosynthetic prokaryotes: Cell differentiation and functions.* Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, pp 265-280.
- Chen C, van Baalen C, Tabit FR, (1978) DL-7-Azatryptophan and citrulline metabolism in the cyanobacterium *Anabaena* spp. strain 1F. *J. Bact.* 169:1114-1119.

Farkas DH, Skomra CJ, Anderson GR, Hughes Jr RG (1987) *In situ* staining procedure for the detection of ornithine transcarbamylase activity in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 160:421-428.

Fay (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microb. Rev.* 56:340-373

Gupta M and Carr NG (1981a) Enzymology of arginine metabolism in heterocyst-forming cyanobacteria. *FEMS Microb. Lett.* 12:179-181.

Gupta M and Carr NG (1981b) Enzyme activities related to cyanophycin metabolism in heterocysts and vegetative cells of *Anabaena* spp. *J. Gen. Microb.* 125:17-23.

Holm-Hansen O, Brown GW (1963) Ornithine cycle enzymes in the blue-green alga *Nostoc muscorum*. *Plant Cell Physiol.* 4:299-306.

Lawrie AC (1979) Effect of carbamoyl phosphate on nitrogenase in *Anabaena cylindrica* Lemm. *J. Bac.* 139:115-119.

Lehninger AL (1982) *Principles of Biochemistry*. Worth Publ Inc, New York.

Lindblad P (1990) Nitrogen and carbon metabolism in coralloid roots of cycads. *Mem. NY Bot. Gard.* 57:104-113.

- Lindblad P and Guerrero MG (1993) Nitrogen fixation and nitrate reduction. *En:* Hall DO, Scurlock JMO, Bolh ar-Nordenkampf HR, Leegood RC and Long SP [Eds] *Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory guide*. Chapman and Hall, London, pp 299-312.
- Lindblad P & Bergman B (1989) The cycad-cyanobacterial symbiosis. *En:* Rai AN [Ed.] *Handbook of symbiotic cyanobacteria*. CRC Press, Boca Raton, pp 137-159.
- Lindblad P, Atkins CA, Pate JS (1991) N₂-fixation by freshly isolated *Nostoc* from coralloid roots of the cycad *Macrozamia riedlei* (Fisch. ex Gaud.) Gardn. *Plant Physiol.* 95:753-759.
- Lindblad P (1992) Ornithine cycle in *Nostoc* PCC 73102. Occurrence and localization of ornithine carbamoyl transferase and the effects of external carbon and ornithine on nitrogenase activity and citrulline synthesis. *Phys. Plant.* 84:275-282.
- Linko P, Holm-Hansen O, Bassham JA, Calvin M (1975) Formation of radioactive citrulline during photosynthetic C¹⁴O₂-fixation Holm-hansen by blue-green algae. *Plant Physiol.* 95:753-759.
- Mackerras AH, De Chazal NM and Smith GD (1990b) Transient accumulations of cyanophycin in *Anabaena cylindrica* and *Synechocystis* 6308. *Journal of General Microbiology* 136:2057-2065.

- Mackerras AH, Younes BN, Weir RC and Smith GD (1990a) Is cyanophycin involved in the integration of nitrogen and carbon metabolism in cyanobacteria *Anabaena cylindrica* and *Gloeotheca* grown on light/dark cycles? *Journal of General Microbiology* 136:2049-2056.
- Pate JS, Lindblad P, Atkins CA (1988) Pathways of assimilation and transfer of fixed nitrogen in coralloid roots of cycad. *Planta* 176:461-471.
- Postage JR (1987) *Nitrogen fixation*, 2nd edition. Edward Arnold Publ., Ltd. London.
- Rippka R and Waterbury JB (1977) The synthesis of nitrogenase by non-heterocystous cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 2:83-86.
- Schubert KR and Boland MJ (1990) The ureides. *In*: Mifflin BJ and Lea PJ [Eds] *The biochemistry of plants, A comprehensive treatise*, vol. 16. Academic Press, San Diego, pp 197-282.
- Simon RD (1976) The biosynthesis of multi-L-arginyl poly(L-aspartic acid) in the filamentous cyanobacterium *Anabaena cylindrica*. *Biochim Biophys Acta* 422:407-418.
- Sprent JI, Sprent P (1990) *Nitrogen fixing organisms*. Pure and applied aspects. Chapman and Hall. University Press, Cambridge.

Stanier RY, Kunisawa R, Mandel M and Cohen-Bazier G (1971) Purification and properties of unicellular bluegreen algae (Order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35:171-205.

Weathers PJ, Chee HL and Allen MM (1978) Arginine catabolism in *Aphanocapsa* 6308. *Archives of Microbiol* 118:1-6.