



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOQUÍMICA DE LA REGULACIÓN DE LA
BIOSÍNTESIS DE LA L-ARGININA EN *Sinorhizobium meliloti* Rm1021

TESIS QUE PARA OPTAR POR R EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
VICTOR MANUEL HERNÁNDEZ LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DR. MICHAEL FREDERICK DUNN G.
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS
INSTITUTO DE QUÍMICA

CUERNAVACA, MORELOS. MARZO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme las herramientas necesarias para mi desarrollo académico.

Al Centro de Ciencias Genómicas (CCG) por facilitarme sus instalaciones durante el Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca para realizar mis estudios.

A la Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM por financiar el proyecto de investigación (IN212008 y IN208811).

RESUMEN

A nivel intracelular la L-arginina es un aminoácido proteogénico y también un precursor en la síntesis de antibióticos, poliaminas, sideróforos, prolina y cianoficina. En bacterias su biosíntesis involucra ocho reacciones enzimáticas codificadas por los genes *argA*, *argB*, *argC*, *argD*, *argE*, *argF*, *argG*, *argH* y *argJ*, donde la formación de ciertos intermediarios, así como la regulación del flujo metabólico puede diferir dependiendo de la especie, dando origen a tres rutas: i) la lineal encontrada en *Escherichia coli*; ii) la del reciclaje presente en *Pseudomonas aeruginosa* y iii) la de la *N*²-acetilcitrulina, elucidada en *Xanthomonas campestris*. En las dos primeras variantes se genera L-ornitina como un intermediario, el cual es un aminoácido no proteogénico necesario en el establecimiento de una simbiosis efectiva entre *Medicago sativa* y *Sinorhizobium meliloti*. Además, esta bacteria pertenece a las rizobias, las cuales tienen la capacidad de reducir nitrógeno atmosférico cuando se asocian de forma simbiótica con plantas leguminosas, por lo cual son de importancia agronómica y en las que hasta ahora se desconoce la ruta que utilizan para la biosíntesis de L-arginina. Basados en lo mencionado, el objetivo del trabajo fue caracterizar genética y bioquímicamente la regulación de la biosíntesis del aminoácido en *S. meliloti* y utilizarlo como modelo de estudio en las rizobias. El ensayo de actividad enzimática con la *N*-ornitina acetiltransferasa (ArgJ, EC 2.3.1.35) sobreexpresada en *E. coli* BL21(DE3) y purificada por cromatografía de afinidad, demostró que la una enzima es monofuncional, ya que puede transferir el grupo acetilo de la *N*²-acetilornitina (NAO) al L-glutamato formando L-ornitina y *N*-acetilglutamato (NAG), pero es incapaz de utilizar a la acetil-coenzima A (acetil-CoA) como donador del grupo acetilo en la síntesis del NAG, como sucede en las enzimas bifuncionales, realizando la misma función que la *N*-acetilglutamato sintasa (ArgA, EC 2.3.1.1). Este resultado fue corroborado *in vivo*, por un ensayo de complementación heteróloga, al restaurar el crecimiento de una cepa mutante *argE* de *E. coli*, pero no el de una mutante *argA*.

La presencia de una ArgJ monofuncional en *S. meliloti* sugirió la presencia de una ArgA, la cual no fue identificada, pero su actividad fue detectada en el extracto total por medio de ensayos enzimáticos utilizando como sustrato L-[3,4-³H]-glutamato.

Mediante la misma estrategia usada con la ArgJ, la *N*-acetilornitina desacetilasa (ArgE, EC 3.5.1.16) fue analizada, demostrando que es funcional y cuya papel es sintetizar L-ornitina a partir

de NAO de forma similar a ArgJ, pero mediante un mecanismo catalítico distinto, ya que utiliza una molécula de agua liberando un acetato.

La inactivación individual o conjunta de los genes *argE* y *argJ* no mostró un efecto en el crecimiento de la bacteria cuando fue inoculada en medio mínimo succinato-amonio (MSA), debido a la presencia de las hipurato hidrolasas (HipO1, HipO2 y HipO3, EC 3.5.1.32). Las tres enzimas fueron sobreexpresadas y purificadas como se describió, mostrando actividad de desacetilación para NAO *in vitro* similar a la ArgE, pero su función *in vivo* únicamente fue corroborada para la HipO1 y HipO2 por ensayos de complementación heteróloga en la cepa mutante *argE* de *E. coli*. Por medio del modelado de la estructura de HipO1 se demostró que las HipOs son homólogas de la ArgE, ya que pueden realizar la misma función y tienen una estructura similar.

La redundancia genética a nivel de la síntesis de L-ornitina por la presencia de ArgE, ArgJ y HipOs no es exclusiva de *S. meliloti*, ya que el 89 % de las bacterias cuyo genoma ha sido secuenciado y situado en la base de datos KEGG, presentan al menos dos de los genes. De forma general, la redundancia genética es un fenómeno común y evolutivamente conservada debido a que brinda robustez contra perturbaciones genéticas, las enzimas muestran diferente eficiencia metabólica, la suma de sus actividades permite un incremento en la producción del metabolito, sus productos se traslapan parcialmente con sus sustratos específicos y los genes o proteínas difieren en su regulación.

Debido a la ausencia de regulación genética en los genes *argB*, *argE* y *argJ* demostrado por los ensayos transcripcionales utilizando el gen reportero *gusA*, el flujo metabólico es regulado a nivel bioquímico por medio de la inhibición de la N-acetilglutamato quinasa (ArgB, EC:2.7.2.8) por L-arginina, demostrado por el ensayo de actividad con la enzima recombinante purificada.

Derivado de los resultados, se concluye que la biosíntesis de la L-arginina en *S. meliloti* se realiza por medio de la ruta del reciclaje, la cual es más evolucionada con parada con la ruta lineal, debido a que el grupo acetilo es reciclado, mostrando redundancia genética en la síntesis de L-ornitina.

ABSTRACT

At the intracellular level, L-arginine is a proteogenic amino acid and also a precursor in the synthesis of antibiotics, polyamines, siderophores, proline and cyanophyllin. Its biosynthesis involves eight enzymatic reactions encoded by the genes *argA*, *argB*, *argC*, *argD*, *argE*, *argF*, *argG*, *argH* and *argJ*, which can vary in their function of the species, giving rise to three variants: i) the linear route found in *Escherichia coli*; ii) the recycling present in *Pseudomonas aeruginosa* and iii) the route of the *N*²-acetylcitrulline elucidated in *Xanthomonas campestris*. In the first two variants L-ornithine is generated as an intermediate, which is a non-proteogenic amino acid necessary in the establishment of an effective symbiosis between *Medicago sativa* and *Sinorhizobium meliloti*. In addition, there are bacteria that belong to the rhizobias, which can affect atmospheric nitrogen when it is symbiotically associated with leguminous plants, so they are of agronomic importance and in which the type of route they present is unknown. Based on the above, the objective of the work is to characterize genetically and biochemically the regulation of the amino acid biosynthesis in *S. meliloti*, to use it as a study model in rhizobias. The enzyme activity assay with *N*-ornithine acetyltransferase (ArgJ, EC 2.3.1.35) overexpressed in *E. coli* BL21(DE3) and purified by affinity chromatography, demonstrated that it is a monofunctional enzyme, since it can affect the acetyl group of the *N*²-acetylornithine (NAO) to L-glutamate forming L-ornithine and *N*-acetylglutamate (NAG), but is unable to use acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) as a donor of the acetyl group in the synthesis of NAG as occurs in bifunctional enzymes, performing the same function as *N*-acetylglutamate synthase (ArgA, EC 2.3.1.1). This result was corroborated *in vivo*, by a heterologous complementation test, by restoring the growth of an *argE* mutant strain of *E. coli*, but not that of an *argA* mutant.

The presence of a monofunctional ArgJ in *S. meliloti* suggested the presence of an ArgA, the quality was not identified, but its activity was detected in the total extract by means of enzymatic tests using as substrate L- [3,4-³H] - glutamate

Using the same strategy used with ArgJ, *N*-acetylornithine deacetylase (ArgE, EC 3.5.1.16) was analyzed, demonstrating that it is functional and whose role is to synthesize L-ornithine from NAO similar to ArgJ, but by a different catalytic mechanism, since it uses a molecule of water and acetate release.

Individual or joint inactivation of the *argE* and *argJ* genes not selected an effect on growth, due to the presence of hippurate hydrolases (HipO1, HipO2 and HipO3, EC 3.5.1.32). The three enzymes were overexpressed and purified as described, showing deacetylation activity for NAO *in vitro* similar to ArgE, but their *in vivo* function could be corroborated for HipO1 and HipO2 by heterologous complementation assays in the *E. coli argE* mutant strain. By modeling the structure of HipO1 it was shown that HipOs are homologous to ArgE, since they can perform the same function and have a similar structure. The genetic redundancy at the level of L-ornithine synthesis due to the presence of ArgE, ArgJ and HipOs is not exclusive to *S. meliloti*, since 89% of the bacteria whose genome has been sequenced and placed in the database of KEGG presents at least two of the genes. In general, genetic redundancy is a common phenomenon and evolutionarily conserved because it provides robustness against genetic disturbances, enzymes that have different metabolic efficiency, the sum of their activities allows an increase in metabolite production, their products overlapping in their specific substrates and genes or proteins differ in their regulation.

Due to the absence of genetic regulation in the *argB*, *argE* and *argJ* genes determined by transcriptional assays using the *gusA* reporter gene, the metabolic flow is regulated at the biochemical level by means of the inhibition of *N*-acetylglutamate kinase (ArgB, EC: 2.7.2.8) by L-arginine, demonstrated by the activity test with the purified recombinant enzyme.

Derived from the results, it is concluded that the biosynthesis of L-arginine in *S. meliloti* is done through the recycling route, which is more evolved with a stop with the linear route, because the acetyl group is recycled, showing genetic redundancy in the synthesis of L-ornithine.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 GENERALIDADES DE LOS AMINOÁCIDOS	3
2.2 BIOSÍNTESIS DE LOS AMINOÁCIDOS.....	3
2.2.1 FAMILIA DEL α -CETOGLUTARATO	5
2.2.2 FAMILIA DEL 3-FOSFOGLICERATO	5
2.2.3 FAMILIA DEL OXALOACETATO	5
2.2.4 FAMILIA DEL PIRUVATO	6
2.2.5 FAMILIA DEL FOSFOENOLPIRUVATO Y ERITROSA-4-FOSFATO	6
2.2.5 FAMILIA DE LA RIBOSA-5-FOSFATO.....	6
2.3 EL AMINOÁCIDO L-ARGININA.....	7
2.3.1 IMPORTANCIA DE LA L-ARGININA EN BACTERIAS.....	7
2.3.2 BIOSÍNTESIS DE L-ARGININA EN BACTERIAS.....	11
2.3.2.1 RUTAS DE BIOSÍNTESIS	11
2.3.2.1.1 LA RUTA LINEAL.....	12
2.3.2.1.2 RUTA DEL RECICLAJE	13
2.3.2.2.3 RUTA DE LA N ² -ACETILCITRULINA	13
2.3.3 LA N-ACETILGLUTAMATO SINTASA	14
2.3.3.1 LA ArgA.....	14
2.3.3.2 LA ArgAB.....	16
2.3.3.3 LA Arg(A)	17
2.3.4 N-ACETILGLUTAMATO QUINASA.....	18
2.3.4.1 LA ArgB NO INHIBIDA POR L-ARGININA	19
2.3.4.2 LA ArgB INHIBIDA POR L-ARGININA	19
2.3.5 LA N-ACETILORNITINA DESACETILASA	21
2.3.6 LA N-ORNITINA ACETILTRANSFERASA.....	22
2.3.7 EL GEN <i>hipO</i>	25
2.3.8 REGULACIÓN GENÉTICA	25
2.3.8.1 REGULADOR ArgR/AhrC DE ENTEROBACTERIAS Y <i>Bacillus</i>	26
2.3.8.2 REGULADOR ArgR DE <i>Pseudomonas</i>	27
2.3.9 BIOSÍNTESIS DE L-ARGININA EN LAS RHIZOBIAS	28
2.3.10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN.....	31
3. HIPÓTESIS.....	32
4. OBJETIVO.....	32
4.1 GENERAL.....	32
4.1.1 ESPECÍFICOS	32
4. METODOLOGÍA	33
4.1 MEDIOS DE CULTIVO	33
4.2 IDENTIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA QUE SINTETIZA EL NAG.....	33
4.2.1 MUTAGÉNESIS AL AZAR	33
4.2.2 COMPLEMENTACIÓN CON UN BANCO DE CÓSMIDOS.....	34
4.2.3 ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA ArgA.....	34
4.3 ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS ArgJs.....	35
4.3 MODELADO DE HipO1.....	36

4.3 SIMILITUD ESTRUCTURAL.....	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 LA ArgJ ES MONOFUNCIONAL.....	37
5.1 LA Arg(A) NO FUE IDENTIFICADA.....	40
5.2 LA ArgB ES INHIBIDA POR L-ARGININA.....	41
5.3 LA ArgE ES FUNCIONAL.....	44
5.5 LAS HipOs SON RESPONSABLES DE SINTETIZAR L-ORNITINA EN LA CEPA MUTANDE <i>argEJ</i> DE <i>S. meliloti</i>	47
5.6 LOS GENES <i>argB</i> , <i>argE</i> Y <i>argJ</i> NO SON REGULADOS TRANSCRIPCIONALMENTE.....	50
6. DISCUSIÓN.....	51
6.1 LOS GENES <i>arg</i> CARECEN DE SINTENIA.....	51
6.2 LA ArgJ DE <i>S. meliloti</i>	51
6.3 LA Arg(A) DE <i>S. meliloti</i>	52
6.4 LA ArgB DE <i>S. meliloti</i>	54
6.5 LA ArgE DE <i>S. meliloti</i>	55
6.6 LA PROTEÍNAS HipO DE <i>S. meliloti</i>	56
6.6 HOMOLOGÍA ENTRE HipO y ArgE EN <i>S. meliloti</i>	56
6.7 REDUNDANCIA GENÉTICA EN LA SÍNTESIS DE L-ORNITINA EN BACTERIAS.....	57
6.8 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS DE L-ARGININA EN <i>S. meliloti</i>	60
6.9 <i>S. meliloti</i> PRESENTA LA VÍA DEL RECICLAJE.....	60
7. CONCLUSIONES.....	63
8. PERSPECTIVAS.....	65
9. ANEXO.....	66
10. LITERATURA CITADA.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de las rutas de biosíntesis de la L-arginina en las bacterias.....	2
Figura 2. Esquema de la biosíntesis de los aminoácidos.....	4
Figura 3. Esquema del metabolismo de la L-arginina en bacterias..	8
Figura 4. Árbol filogenético de las ArgJs caracterizadas.....	23
Figura 5. Alineamiento de las secuencias de las ArgJs..	39
Figura 6. Alineamiento de las secuencias de las ArgBs.	43
Figura 7. Alineamiento de las secuencias de las ArgEs.	46
Figura 8. Alineamiento de las secuencias de las HipOs.....	49
Figura 9. Comparación de la estructura cristalográfica de la ArgE y el modelo de HipO1.	57
Figura 10. Esquema de las rutas de la biosíntesis de L-arginina.	62

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Familias de aminoácidos con base en sus precursores metabólicos.	5
Cuadro 2. Cepas y plásmidos utilizados en la mutagénesis al azar.	34
Cuadro 3. Cepas y plásmidos utilizados en el ensayo de complementación.	34
Cuadro 4. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre las ArgJs	40
Cuadro 5. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre las ArgBs.	44
Cuadro 6. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre las ArgEs.	45
Cuadro 7. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre las HipOs.....	48
Cuadro 8. Características generales de las HipOs.	48
Cuadro 9. Distribución de las enzimas ArgE, ArgJ y HipO en los Phyla bacterianos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS Y CLAVES

°C:	Grados centígrados
Å:	Angstrom
Acetil-CoA:	Acetil-coenzima A
ACY1:	Aminoacilasa 1
ADC:	Arginina descarboxilasa
ADH:	Arginina oxidasa/ deshidrogenasa/ transaminasa
ADI:	Arginina deiminasa
AIH:	Agmatina imidohidrolasa
AK:	Aspartato quinasa
AKK:	Aminoácido quinasa
Ap:	Ampicilina
ARG:	Arginasa
ArgA:	N-acetilglutamato sintasa
ArgB:	N-acetilglutamato quinasa
ArgC:	N-acetilglutamato 5-fosforeductasa
ArgD:	N-acetilornitina aminotransferasa
ArgE:	N-acetilornitina desacetilasa
ArgF:	Ornitina transcarbamoilasa
ArgG:	Ornitina transcarbamoilasa
ArgH:	Argininosuccinato liasa
ArgJ:	N-ornitina acetiltransferasa
ASL:	Argininosuccinato liasa
AST:	Arginina succinilasa
ASSY:	Argininosuccinato sintasa
ATP:	Adenosín trifosfato
BstArgR:	ArgR de <i>Bacillus stearothermophilus</i>
BsuAhrC:	ArgR de <i>Bacillus subtilis</i>
CK:	Carbamato quinasa
CP:	Carbamoil fosfato
CPA:	Carbamoilputrescina amidohidrolasa
CPG2:	Carboxipeptidasa G2
CPS:	Carbamoil fosfato sintetasa
CO ₂ :	Dióxido de carbono
COOH:	Carboxilo
CTP:	Citidina trifosfato
dATP:	Desoxiadenosina trifosfato
DmpA:	D-Ala-esterasa/amidasa
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DO ₆₂₀ :	Densidad óptica a 620 nm
EtcB:	L-ornitina N ⁵ -monooxigenasa
FAD:	Flavín adenín dinucleótido
FomA:	Quinasa de resistencia a fosfomicina
<i>g</i> :	Gravedad
GNAT:	N-acetiltransferasas relacionadas a GCN5

GSH:	Glutati3n
GTP:	Guanos3n trifosfato
h:	Horas
kDa:	Kilodalton
CG:	Cetoglutarato
Km:	Kanamicina
K_m :	Constante de Michaelis
Mcd:	Malonil-CoA descarboxilada
mg:	Miligramos
min:	Minutos
mL:	Mililitros
mM:	Milimolar
MM9:	Medio m3nimo M9
MSA:	Medio m3nimo succinato-amonio
Mur:	3cido mur3mico
NAD ⁺ :	Nicotinamida adenina dinucle3tido en su forma oxidada
NADH:	NAD en su forma reducida
NAG:	N-acetilglutamato
Nal:	3cido nalid3xico
NAO:	N ² -acetilornitina
NAT:	N-acetiltransferasa
Neo:	Neomicina
ng:	Nanogramos
NH ₂ :	Amino
NH ₃ :	Amoniac
NH ³⁺ :	Amino protonado
NH ⁴⁺ :	Amonio
nm:	Nan3metros
Ntn:	N-terminal nucleofilas
ODC:	Ornitina descarboxilasa
PBS:	Buffer fosfato salino
pH:	Potencial de Hidrogeno
pl:	Punto Isoel3ctrico
RNA:	3cido ribonucleico
SDPD:	Succinildiaminopimelato desuccinilasa
Sm:	Estreptomina
Sp:	Espectinomicina
Tc:	Tetraciclina
tRNA:	RNA de transferencia
μ L:	Microlitros
UMP:	Urid3n monofosfato
UMPK:	UMP quinasa
UTP:	Urid3n trifosfato
V_{max} :	Velocidad m3xima

1. INTRODUCCIÓN

La L-arginina es un aminoácido que a nivel intracelular no solamente es un componente estructural de diversas proteínas (Chen et al., 2016), sino que además, forma parte de la pared celular (Vollmer, 2012) y membrana externa (Gao et al., 2004). Por otra parte, es precursor de poliaminas (Alcázar et al., 2010), antibióticos, sideróforos (Robbel et al., 2011) y funge como almacenamiento de energía, nitrógeno y carbono en algunas bacterias (Maheswaran et al., 2006).

Dada la importancia fisiológica que representa el aminoácido, el estudio de su biosíntesis ha sido el centro de interés de distintas áreas de la biología durante los últimos 60 años. Esta procede a través de ocho pasos, los cuales pueden diferir en bacterias en la formación de ciertos intermediarios y regulación del flujo metabólico, dando origen a tres rutas: i) la lineal ocurre a través de la acetilación de los primeros cuatro intermediarios, donde el grupo acetilo de la NAO es retirado por una ArgE y la regulación bioquímica es por inhibición de producto en la ArgA; ii) la del reciclaje, donde el grupo acetilo es reutilizado para la síntesis de *N*-acetilglutamato (NAG) a través de una ArgJ y su regulación es por medio de la inhibición de la ArgB por L-arginina; iii) la tercera consiste de cinco intermediarios acetilados donde la *N*²-acetilornitina es desacetilada por una ArgE' y su regulación ocurre en la ArgAB, por producto (Cunin et al., 1986; Xu et al., 2007) (Figura 1). A nivel genético en enterobacterias (Maas, 1994), *Bacillus* spp. (Garnett et al., 2008) y *Pseudomonas* spp. (Lu et al., 2004), la ruta metabólica de la L-arginina es controlada por el regulador ArgR, inhibiendo la transcripción de los genes de biosíntesis o promoviendo los de degradación, dependiendo de los niveles intracelulares del aminoácido (Gardan et al., 1995; Lu et al., 1992; Maghnoúj et al., 1998).

En las rhizobias, los microorganismos que tienen la capacidad de fijar nitrógeno cuando se asocian con plantas leguminosas, la biosíntesis de la L-arginina no ha sido totalmente entendida, así como su importancia en la nodulación y la reducción biológica de nitrógeno (Dunn, 2015); por lo que su estudio en *S. meliloti* como modelo sería de gran utilidad, ya que permitiría conocer la regulación de la vía, la síntesis de intermediarios clave como la L-ornitina y el tipo de vía utilizada en este grupo de bacterias, las cuales son de importancia agronómica.

Figura 1. Esquema de las rutas de biosíntesis de la L-arginina en las bacterias (modificado de Xu et al., 2007). Cada tipo de línea representa una ruta: a) en continuas, la vía lineal presente en los *Enterobacteriaceae* y *Myxococcus* sp; b) en guiones, la vía del reciclaje, presente en *Pseudomonas*, las Cianobacterias, bacterias fotosintéticas, *Thermus aquaticus* y *Micrococcus glutamicus* y c) en guiones y puntos, la vía de la N²-acetilcitrulina, presente en *X. campestris* y *Xylella fastidiosa*.

2. ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES DE LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son compuestos orgánicos simples que contienen al menos un grupo funcional amino (-NH₂) y carboxilo (-COOH). Los L- α -aminoácidos y la glicina pueden ser considerados como los bloques que componen la vida, ya que a partir de ellos se construyen las proteínas en todos los organismos. En la naturaleza también se pueden encontrar los D-isómeros como la D-alanina que forma parte de la pared celular de las bacterias y, los β - y γ -aminoácidos como la β -alanina que es componente de la vitamina B5 y γ -aminobutirato como un neurotransmisor (Wendisch, 2007).

A diferencia de las proteínas maduras que contienen diferentes aminoácidos debido a las modificaciones postraduccionales, solamente 22 L- α -aminoácidos son genéticamente codificados, los cuales son usados en la biosíntesis de proteínas como amino acil-tRNAs. Desde el desciframiento del código genético para los 20 aminoácidos hace aproximadamente 50 años (Chambers et al., 1986; Zinoni et al., 1986), se han descubierto hasta la fecha los códigos para L-selenocisteína y L-pirrolisina (Hao et al., 2002; Srinivasan et al., 2002).

Los L-aminoácidos esenciales como la isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano y valina no pueden ser sintetizados por los humanos, por lo que deben ser suplementados en la dieta. Adicionalmente en los infantes también son necesarios la arginina y la histidina en la dieta. En los microorganismos la capacidad de sintetizar de *novo* los aminoácidos varía considerablemente, por ejemplo *Leuconostoc mesenteroides* únicamente crece cuando se adiciona al medio 16 de los 22 aminoácidos, mientras que bacterias como *E. coli*, *Bacillus subtilis* y *Corynebacterium glutamicum* son capaces de sintetizar de *novo* todos los aminoácidos a partir de amonio (NH₄⁺) (Wendisch, 2007).

2.2 BIOSÍNTESIS DE LOS AMINOÁCIDOS

Todos los aminoácidos son derivados de intermediarios del metabolismo central (Figura 2), donde el nitrógeno es incorporado en forma de L-glutamato o L-glutamina (Deferrari et al., 2010).

Las rutas para la síntesis de aminoácidos esenciales están presentes solamente en microorganismos y plantas, por lo que la hipótesis es que las enzimas necesarias para su biosíntesis en los animales se perdieron durante los primeros pasos de evolución, debido a que podían adquirirlos al alimentarse de otros organismos que los sintetizaban (Payne y Loomis, 2006). El número de pasos involucrados para la síntesis de los aminoácidos esenciales va de cuatro a ocho, a diferencia de los no esenciales, los cuales son más simples (Deferrari et al., 2010). Con base en su precursor metabólico los aminoácidos pueden ser agrupados en familias (Cuadro 1).

Figura 2. Esquema de la biosíntesis de los aminoácidos a partir de intermediarios de la glicólisis, ciclo del ácido cítrico y ruta de la pentosa fosfato. Los precursores están en cuadros (modificado de Deferrari et al., 2010; Hirasawa y Shimizu, 2016).

Cuadro 1. Familias de aminoácidos con base en sus precursores metabólicos.

α-Cetoglutarat Glutamato Glutamina Arginina [†] Prolina	Oxaloacetato Aspartato Asparagina Metionina* Treonina* Isoleucina* Lisina*	Fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato Fenilalanina* Tirosina Triptófano*
3-Fosfoglicerato Serina Cisteína Glicina	Piruvato Alanina Valina* Leucina*	Ribosa-5-fosfato Histidina [†]

* aminoácidos esenciales

† aminoácidos también esenciales en niños.

2.2.1 FAMILIA DEL α -CETOGLUTARATO

Ésta familia consiste del L-glutamato y todos sus aminoácidos derivados: la L-arginina, L-glutamina y L-prolina. La importancia de la familia radica en que esencialmente la mayoría de los átomos de nitrógeno de los demás aminoácidos derivan directa o indirectamente del L-glutamato o L-glutamina (Walker y van der Donk, 2016).

2.2.2 FAMILIA DEL 3-FOSFOGLICERATO

El principal aminoácido de esta familia es la L-serina, a partir del cual se derivan tanto la L-cisteína como la L-glicina. La ruta además de cubrir las necesidades metabólicas para la síntesis de proteínas con los tres aminoácidos, también sirve como fuente precursora en la síntesis de otros metabolitos. Por ejemplo, la conversión de L-serina a glicina provee una fuente de carbono para la biosíntesis de purinas, timina, L-metionina y L-histidina. Por otra parte, la cadena de carbonos de la L-serina es directamente incorporada al L-triptófano (Umbarger, 1978; Deferrari et al., 2010).

2.2.3 FAMILIA DEL OXALOACETATO

En bacterias el L-aspartato es precursor de la síntesis biológica de la L-lisina, L-treonina y L-metionina. Los esqueletos de carbono de la L-lisina y L-isoleucina son derivados en parte del piruvato, pero son considerados parte de la familia del oxaloacetato. El diaminopimelato es un precursor de L-lisina, necesario para la síntesis de la pared celular en bacterias, pero no para la síntesis de proteínas. Por otro lado, el grupo sulfuro de L-metionina es derivado de la

L-cisteína. Debido a que los aminoácidos de esta familia se forman a través de vías muy ramificadas, se han creado potencialmente numerosos puntos de regulación del flujo de carbono, los cuales han evolucionado en diversos organismos (Viola, 2001).

2.2.4 FAMILIA DEL PIRUVATO

La familia consiste de tres aminoácidos, donde la mayoría de sus carbonos derivan del piruvato. La L-isoleucina podría formar parte de la familia porque dos de sus seis carbonos derivan del piruvato, además comparte con la L-valina un conjunto de enzimas en los primeros pasos de su biosíntesis. La L-lisina también podría ser considerado un miembro del grupo, ya que la mitad de sus carbonos podrían derivar del piruvato dependiendo del grupo carboxilo del *meso*-diaminopimelato que se pierda en la etapa final de su síntesis (Hirasawa y Shimizu, 2016).

2.2.5 FAMILIA DEL FOSFOENOLPIRUVATO Y ERITROSA-4-FOSFATO

En ésta ruta biosintética, se encuentran ejemplos de enzimas multifuncionales, en los que un polipéptido cataliza dos o más reacciones separadas químicamente. En algunos casos estas reacciones son pasos consecutivos en la vía, mientras otros son distantes. Muchas de las enzimas multifuncionales forman complejos más grandes para funcionar de manera conjunta. La L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptófano comparten una ruta en común hasta el corismato, compuesto a partir del cual se ramifica hacia su respectiva biosíntesis. En algunos organismos la L-fenilalanina y L-tirosina comparten un paso adicional, mientras que en otros están separadas (Deferrari et al., 2010; Hirasawa y Shimizu, 2016).

2.2.5 FAMILIA DE LA RIBOSA-5-FOSFATO

El estudio de la ruta de biosíntesis de la L-histidina en eucariontes inferiores, ha sido fundamental en el descubrimiento de muchos mecanismos biológicos. Por ejemplo, en el desarrollo de la teoría operón (Ames et al., 1960, 1963; Hartman, 1956) y en la definición de los mecanismos que controlan su expresión (Anton, 1968;. Fink et al, 1967 ; Silbert et al., 1966). Ésta vía también es considerada una piedra angular en la fundación y evolución de

conceptos sobre la evolución de las rutas biosintéticas y biología celular moderna (Alfano et al., 1996; Jastrzębowska y Gabriel, 2015).

2.3 EL AMINOÁCIDO L-ARGININA

La L-arginina es un aminoácido versátil que cumple con diversas funciones celulares. Su peso molecular es de 174 g mol^{-1} , con valores de pK_a de 2.17, 9.04 y 12.48 para $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_3^+$ y el grupo R, respectivamente. Su pI es de 10.76 e índice de hidropático de -4.5, clasificado como un aminoácido básico, cargado positivamente y muy polar en condiciones fisiológicas (Cozzone, 2010). La L-arginina ocupa en promedio 5.1 % de las proteínas como un componente estructural y parte del sitio activo de algunas enzimas (Chen et al., 2016).

2.3.1 IMPORTANCIA DE LA L-ARGININA EN BACTERIAS

La L-arginina forma parte de las proteínas como un componente estructural y además juega un papel muy importante en el metabolismo de las bacterias (Figura 3):

- a) **Reserva de nitrógeno, energía y carbono.** En la mayoría de las cianobacterias y algunas bacterias heterotróficas, la L-arginina es un componente de la cianoficina (Füser y Steinbüchel, 2007), un polímero ramificado formado por un esqueleto de poli- α -ácido aspártico con residuos de L-arginina ligados a los grupos β -carboxilo del aspartato por enlaces isopeptídicos (Simon y Weathers, 1976). Por estudios previos se infiere que la posible función del polímero es almacenar nitrógeno, carbono y energía (Maheswaran et al., 2006).
- b) **Precursor de sideróforos.** La L-ornitina es hidroxilada utilizando $\text{NADH}+\text{H}^+$ en presencia de FAD y oxígeno, por medio de la monooxigenasa EtcB (EC 1.14.13.195) formando la δ -N-hidroxiornitina, que posteriormente es acetilada por la malonil-CoA descarboxilasa utilizando malonil-CoA (Mcd, EC 4.1.1.9) para formar δ -N-acetil- δ -N-hidroxiornitina que en cuatro pasos adicionales dará origen a eritroquelina (D- α -N-acetil-D- δ -acetil- δ -N-hidroxiornitina-D-serina-ciclo(L- δ -N-hidroxiornitina-L- δ -N-acetil- δ -N-hidroxiornitina) (Robbel et al., 2011). El sideróforo es producido en *Saccharopolyspora erythraea* y es un compuesto de bajo peso molecular secretado por la bacteria en condiciones de baja

concentración de hierro (Fe), por lo que su función es unirse al Fe³⁺ y facilitar su transporte al interior de la célula (Haas et al., 2008; Neilands, 1995). Otros sideróforos cuya estructura contiene D o L-ornitina son: tsukubaquelina de *Streptomyces* sp. TM-34 (Kodani et al., 2011); requibactina y requiquelin de *Rhodococcus equi* (Miranda-CasoLuengo et al., 2008); rodoquelina de *Rhodococcus jostii* (Bosello et al., 2011); coeliquelina de *Streptomyces coelicolor* (Challis y Ravel, 2000; Lautru et al., 2005); fuscaquelina de *Thermobifida fusca* (Dimise et al., 2008; Li et al., 2015) y albaquelin de *Amycolatopsis alba* (Kodani et al., 2015a).

Figura 3. Esquema del metabolismo de la L-arginina en bacterias. En color azul se señala la ruta de biosíntesis con algunos intermediarios, en color rojo las cinco rutas de degradación (ADH: arginina oxidasa/ deshidrogenasa/ transaminasa, AST: arginina succinilasa, ADI: arginina deiminasa, ARG: arginasa, ADC: arginina descarboxilasa) y en color verde los compuestos en los que la L-arginina u L-ornitina participan como precursores. CP: carbamoil fosfato; CG: cetoglutarato (modificado de Xu et al., 2007).

- c) **Componente de la membrana externa.** Bajo condiciones limitantes de fosfato algunas bacterias reemplazan los fosfolípidos de la membrana por lípidos que no contengan fósforo, como los lípidos de ornitina (Gao et al., 2004). Estructuralmente el lípido está formado por un grupo de ácido graso 3-hidroxi unido por un enlace amido al grupo α -amino de la L-ornitina, al que posteriormente se unirá otro grupo acil graso por medio de un enlace éster en la posición 3-hidroxilado del primer ácido graso (Geiger et al., 1999). La función de estas moléculas probablemente es estabilizar la membrana externa, decreciendo su fluidez y haciéndola menos permeable para contrarrestar el estrés abiótico por altas temperaturas o bajo pH (Gibbons et al., 2000; Vences-Guzmán et al., 2011).
- d) **Componente de la pared celular.** El péptido que está unido al N-terminal del grupo carboxilo del ácido murámico (Mur) contiene D y L-aminoácidos alternados. En la mayoría de las bacterias la secuencia peptídica es L-alanina-D-glutamato-*m*-ácido diaminopimélico-D-alanina, pero puede mostrar variaciones en las primeras tres posiciones dependiendo de la especie bacteriana y/o las condiciones de crecimiento. En bacterias Gram-positivas como *Spirochaeta stenostrepta*, la posición tres puede ser ocupada por la L-ornitina. Este aminoácido al poseer un grupo amino adicional sirve como punto de unión con la D-alanina en la posición cuatro de otra subunidad peptídica del peptidoglicano. Adicionalmente, algunas otras bacterias como *Butyribacterium rettgeri*, *Corynebacterium poinsettiae* y *Microbacterium liquifaciens* necesitan de un puente interpeptídico que incluye D-ornitina para unir subunidades distintas. Dichos puentes son formados entre el D-glutamato en la posición dos y D-alanina en la posición cuatro de diferentes péptidoglicanos (Vollmer, 2012; Schleifer y Kandler, 1972).
- e) **Precursor de antibióticos.** El ácido clavulánico es un antibiótico que inhibe la actividad de la β -lactamasa (EC 3.5.2.6) y es usado en combinación con otros antibióticos β -lactámicos para tratar un amplio espectro de enfermedades infecciosas (Ser et al., 2016). Fue descubierto inicialmente en *Streptomyces clavuligerus* (Higgins y Kastner, 1971) y posteriormente en otras especies del mismo género (Brown et al., 1976; Jensen y Paradkar, 1999). La L-arginina (Valentine et al., 1993) y el gliceraldehído-3-fosfato

(Khaleeli et al., 1999) son condensados por medio de una carboxietilarginina sintetasa (Ceas, EC 2.5.1.66), para formar la N^2 -(2-carboxietil) arginina, que en siete pasos posteriores dará origen al antibiótico (Song et al., 2010).

- f) **Componente de antibióticos.** La L-ornitina es un componente estructural de dos antibióticos producidos en bacterias del género *Bacillus* sp.: i) La bacitracina A es un antibiótico producido por *B. licheniformis* y *B. subtilis* (Azevedo et al., 1993; Ming y Epperson, 2002). El antibiótico es un dodecapéptido cíclico ramificado, el cual contiene un pentapéptido como N-terminal con una ciclación tipo tiazolina entre una L-isoleucina y una L-cisteína; y un anillo heptapeptídico como C-terminal, formado por el grupo carboxilo libre de L-asparagina del C-terminal y el ϵ -amino de L-lisina. El anillo está compuesto además por D-ornitina, Isoleucina, D-fenilalanina, L-histidina y D-ácido aspártico. El antibiótico es activo contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas, inhibiendo la síntesis de la pared celular (Kopp y Marahiel, 2007; Konz et al., 1997); ii) La gramicidina S es un ciclodecapéptido antimicrobiano aislado de *B. brevis*, formado por (L-prolina-D-fenilalanina-L-leucina-L-ornitina-L-valina)₂ (Abraham et al., 2014). El antibiótico permeabiliza y desestabiliza la membrana por lo que es efectivo contra bacterias Gram positivas y en menor medida contra Gram negativas (Prenner et al., 2004). El compuesto es altamente hemolítico por lo que su uso terapéutico está restringido a aplicaciones tópicas (Kondejewski et al., 1996).
- g) **Precursor de poliaminas.** Las poliaminas son compuestos policatiónicos de bajo peso molecular, que están presentes tanto en eucariontes como procariontes (Alcázar et al., 2010) y cuya función fisiológica involucra la replicación del DNA, transcripción, traducción, tolerancia al estrés abiótico, patogénesis bacteriana, motilidad, formación de biofilm y simbiosis (Di Martino et al., 2013; Dunn, 2015; Valdés-Santiago y Ruiz-Herrera, 2014). La biosíntesis de poliaminas comienza con la formación de la putrescina a partir de L-ornitina por medio de una ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17). Además la putrescina también puede ser sintetizada a partir de L-arginina utilizando una arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19), seguido por dos pasos sucesivos catalizados por la

agmatina imidohidrolasa (AIH, EC 3.5.3.12) y la *N*-carbamoilputrescina amidohidrolasa (CPA, EC 3.5.1.53) (Alcázar et al., 2010).

2.3.2 BIOSÍNTESIS DE L-ARGININA EN BACTERIAS

Una de las razones por las cuales el metabolismo de la L-arginina ha sido centro de interés sobre los últimos 60 años, reside en gran parte a su alto grado de complejidad comparada con otras rutas, lo cual la ha llevado a ser elegida como un modelo de estudio en fisiología molecular. Lo anterior se hace evidente por: i) el extenso número de genes involucrados en su anabolismo; ii) la convergencia con la biosíntesis de pirimidinas en el punto del carbamoil fosfato; iii) tanto la L-ornitina como la L-arginina son precursores para la síntesis de poliaminas y iv) la impresionante variedad de rutas degradativas encontradas en los organismos investigados, donde la mayoría albergan más de una, lo que le permite a la bacteria utilizar el aminoácido bajo distintas circunstancias como aeróbicas y anaeróbicas, por citar algunas (Cunin et al., 1986; Lu, 2006) (Figura 3). Estos motivos llevaron a que el metabolismo de la L-arginina fuera del interés para áreas como la enzimología, mecanismos de control genético y fisiología metabólica (Cunin et al., 1986).

La biosíntesis de la L-arginina involucra ocho reacciones enzimáticas, donde los primeros cuatro intermediarios están acetilados y conducen a la formación de L-ornitina (Vogel, 1970). La conversión de L-ornitina a L-arginina necesita de tres pasos adicionales, involucrando la utilización del carbamoil fosfato (Cunin et al., 1986) (Figura 1). La síntesis de la L-ornitina al igual que la de L-prolina involucra la activación y reducción del grupo 5-carboxilo del L-glutamato. El producto de esta reacción es el L-glutamato-5-semialdehído, que en la forma no acetilada se transforma en pirrolina-5-carboxilato, que posteriormente forma la L-prolina. La *N*-acetilación del L-glutamato previene dicha ciclación, manteniendo separadas a las dos rutas (Vogel, 1970).

2.3.2.1 RUTAS DE BIOSÍNTESIS

Existen tres rutas para la biosíntesis de L-arginina en bacterias, las cuales difieren en la formación de algunos intermediarios, así como la regulación del flujo metabólico: La lineal y

del reciclaje del grupo acetilo proceden a través de la carbamoilación de la L-ornitina, mientras que la tercera por N^2 -acetilornitina.

2.3.2.1.1 LA RUTA LINEAL

La vía comienza con la *N*-acetilación del L-glutamato en el grupo 2-amino a partir de la acetil-coenzima A (acetil-CoA), dicha reacción es catalizada por la enzima ArgA (Maas et al., 1953; Haas et al., 1972; Marvil y Leisinger, 1977; Shi et al., 2008). Posteriormente, el *N*-acetilglutamato es fosforilado en el C₅ utilizando ATP por la ArgB formando el *N*-acetilglutamato-5-fosfato (Fernández-Murga et al., 2004; Fernández-Murga y Rubio, 2008; Haas y Leisinger, 1975; Ramón-Maiques et al., 2002; Vogel y McLellan, 1970; Xu et al., 2012). El siguiente paso es la formación de *N*-acetilglutamato-5-semialdehído por la *N*-acetilglutamato 5-fosforeductasa (ArgC, EC 1.2.1.38) (Xu et al., 2007). En el cuarto paso un grupo amino es transferido a partir de una segunda molécula de L-glutamato dando origen a la NAO, por medio de una *N*-acetilornitina aminotransferasa (ArgD, EC 2.6.1.11) (Winter, 2015). Después de la transaminación en el grupo semialdehído para producir NAO, el grupo acetil es removido en el siguiente paso dando lugar a la formación de L-ornitina.

En los *Enterobacteriaceae* y *Myxococcus* sp. usan la ruta lineal, en la cual la L-ornitina es sintetizada por la ArgE, una enzima hidrolítica (Javid-Majd y Blanchard, 2000; Meinel et al., 1992; Vogel y Bonner, 1956; Vogel y McLellan, 1971). En estos organismos, la ArgA es el punto de regulación por la inhibición de la actividad enzimática con L-arginina (Charlier et al., 1978). Posteriormente, la ornitina transcarbamoilasa (ArgF, EC 2.1.3.3) une el tercer átomo de nitrógeno a partir del carbamoil fosfato, por medio de una carbamoilación del grupo δ -amino de la L-ornitina para formar L-citrulina. Esta reacción requiere carbamoil fosfato, el cual es generado a partir de ATP, bicarbonato y el grupo δ -amino de la L-glutamina por la carbamoil fosfato sintetasa (CPS, EC 6.3.5.5). El cuarto átomo de nitrógeno de la L-arginina se deriva del L-aspartato, el cual es ligado a la L-citrulina por la argininosuccinato sintasa (ArgG, EC 6.3.4.5) y finalmente, la argininosuccinato liasa (ArgH, EC 4.3.2.1) genera fumarato y L-arginina a partir del argininosuccinato (Winter, 2015; Xu et al., 2007).

2.3.2.1.2 RUTA DEL RECICLAJE

En esta vía, la biosíntesis de L-arginina varía en el paso cinco y el punto de regulación del flujo metabólico, respecto a la vía lineal (Figura 1). En *Pseudomonas*, las Cianobacterias, bacterias fotosintéticas, *Thermus aquaticus* y *Micrococcus glutamicus*, el grupo acetilo de la NAO es reciclado y transacetilado al L-glutamato por la ArgJ (Van De Castele et al., 1990; Baetens et al., 1998; Haas et al., 1977; Hindle et al., 1994; Kershaw et al., 2002; Marc et al., 2000; 2001; Martin y Mulks, 1992; O'Reilly y Devine, 1994; Picard y Dillon, 1989; Rodríguez-García et al., 2000; Sakanyan et al., 1992; 1993; Udaka y Kinoshita, 1958). En estos organismos la ArgA tiene una función anaplerótica y la ArgB es inhibida por L-arginina regulando la vía. Como el ciclo del acetilo es de significancia energética, a esta ruta se le considera más evolucionada (Xu et al., 2007). En algunos organismos como *Geobacillus stearothermophilus*, la acetiltransferasa demuestra una actividad tanto de N-acetilglutamato sintasa como ornitina acetiltransferasa (Sakanyan et al., 1992; 1993), aunque no existe homología entre *argA* y *argJ*; mientras que en otras especies como *Corynebacterium glutamicum* es monofuncional (Sakanyan et al., 1996).

2.3.2.2.3 RUTA DE LA N²-ACETILCITRULINA

La vía ha sido reportada en las especies *Xanthomonas campestris* y *Xylella fastidiosa*, la cual se caracteriza por la presencia de una ArgAB que cataliza las primeras dos reacciones de la biosíntesis y además, la enzima es inhibida por retroalimentación con L-arginina, siendo el punto de regulación del flujo metabólico (Qu et al., 2007; Shi et al., 2011). Adicionalmente, la vía sufre otra modificación, ya que a diferencia de las descritas, la carbamoilación se realiza directamente en la NAO por medio de un ArgF' (EC 2.1.3.9), generando N²-acetilcitrulina. Este compuesto es desacetilado por una ArgE generando acetato y L-citrulina (Morizono et al., 2006; Shi et al., 2005; 2006; 2007). Los pasos posteriores transcurren de forma similar a la ruta lineal y del reciclaje hasta la formación de L-arginina.

La biosíntesis de L-arginina en procariontes presenta diferencias en algunos de los pasos, por lo que a continuación se describirá con mayor detalle el paso uno, dos y cinco.

2.3.3 LA N-ACETILGLUTAMATO SINTASA

Las enzimas que catalizan la acetilación del L-glutamato son muy variadas comparada con otras enzimas de la biosíntesis de L-arginina, de forma que pueden ser clasificadas en tres tipos: i) la ArgA clásica, ii) la ArgAB bifuncional y iii) la ArgA corta (Arg(A)).

2.3.3.1 LA ArgA

La mejor conocida es la ArgA clásica, la cual ha sido ampliamente estudiada en *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria gonorrhoeae* (Haas et al., 1972; Marvil y Leisinger, 1977; Shi et al., 2008). Los ensayos de actividad con diferentes aminoácidos y donadores el grupo acetilo, demostraron que la enzima utiliza L-glutamato (K_m de 4.5 mM a 5.2 mM) y acetil-CoA (K_m de 0.09 mM a 0.1 mM) como sustratos preferentemente (Marvil y Leisinger, 1977; Sancho-Vaello et al., 2012). También puede usar L-glutamina o L-2-aminoadipato como aminoácido aceptor del grupo acetil con 6.8 % y 1.3 % de actividad respecto al L-glutamato (Marvil y Leisinger, 1977). Como donador del grupo acetil, el propionil-CoA es funcional en 4.7 % respecto al acetil-CoA (Haas et al., 1972; Marvil y Leisinger, 1977).

La ArgA es el punto de regulación del flujo metabólico, ya que puede ser inhibida de forma alostérica por L-arginina hasta en 50 % en concentraciones de 0.02 mM (Eckhardt et al., 1975; Marvil y Leisinger, 1977). Además, la CoA también puede reducir el 50 % de la actividad en una concentración de 2.5 mM (Marvil y Leisinger, 1977).

La actividad enzimática en condiciones *in vitro* puede ser afectada desde un 43 % hasta un 94 % por la adición de 0.1 mM de Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} o Zn^{2+} ; pero también completamente por la presencia de 1 mM de *N*-etilmaleimida o *p*-cloromercuribenzoato, los cuales reaccionan con los grupos sulfuro libres de la enzima, inhibiendo su actividad. En un buffer de 200 mM de Tris-HCl a pH de 8.5 o 200 mM de glicina-NaOH a pH de 10.0 la enzima muestra la máxima actividad (Marvil y Leisinger, 1977).

En *P. aeruginosa* la enzima está constituida por unidades de 432 residuos dando como resultado un peso de 50 kDa, los cuales puede formar complejos triméricos o hexaméricos, dependiendo de su concentración y la presencia de NAG o L-arginina (Haas et al., 1972;

Sancho-Vaello et al., 2012). Estructuralmente los monómeros de la enzima consisten en una α -hélice, un dominio tipo aminoácido quinasa (AAK), un linker interdominio y un dominio *N*-acetiltransferasa (NAT). Los primeros 19 residuos en el N-terminal forman el α -hélice, que sirve de interfaz para conectar dos monómeros, lo que es similar a las ArgBs inhibidas por L-arginina. El α -hélice es de crucial importancia para la formación de las estructuras hexaméricas y el reconocimiento alostérico de la L-arginina, ya que el segmento C-terminal de la estructura es uno de los sitios de unión al inhibidor (Shi et al., 2008). La delección de los primeros 12 residuos del α -hélice resulta en la formación de complejos diméricos y la disociación de los hexámeros, lo que trae como consecuencia que la ArgA no pueda ser inhibida, a pesar de que la L-arginina podría unirse a los dímeros. La mutación puntual de Y14A incrementa 60 veces la concentración de L-arginina necesaria para la inhibición (Sancho-Vaello et al., 2012).

En el lóbulo N-terminal está el dominio AAK que también se encuentra en las ArgBs y comienza en el residuo 20 y termina en el 281. Este dominio puede ser expresado junto con el α -hélice mencionada y formar complejos hexaméricos, pero sin mostrar actividad sintasa (Sancho-Vaello et al., 2012). A pesar de la identidad (20 %) que muestra con respecto a la segunda enzima de la ruta biosintética, tampoco muestra actividad quinasa, debido a la falta de residuos conservados para la unión del NAG y ATP (Shi et al., 2008). La doble mutación en los residuos que corresponden al centro activo para las ArgBs (M26K y L240K) restauran la actividad quinasa (Sancho-Vaello et al., 2012). En este dominio se encuentran tres residuos conservados que sirven de unión a L-arginina y su mutación puede incrementar la K_i 50 veces (K199A) e incluso evitarla (E269A y G275A) a pesar de que la enzima conserva la estructura hexamérica (Shi et al., 2008).

El péptido que une a los dos dominios en la ArgA de *P. aeruginosa* comienza en el residuo 282 y se prolonga cuatro más. El aumento en la longitud del mismo por el reemplazamiento de los residuos EQF por EQAF, EAQGP, EAQAF, LFQGP o LEVLFQGP reducen la actividad específica de la enzima, al disminuir la V_{max} . El comportamiento de la K_m para L-glutamato varía de acuerdo a la mutación, sin mostrar alguna relación con el tamaño de la modificación. Dichas mutaciones en la enzima eliminan la inhibición por L-arginina en concentraciones de

5 mM y en concentraciones superiores, muestran ligera activación en algunos casos (EQAF, LFQGP y LEVLFQGP). La sustitución de EQF por ERM, EQM, ERF o AQF; reducen la actividad específica de la enzima en la mayoría de los casos (a excepción de EQM). Las enzimas con los dos primeros reemplazamientos no muestran inhibición por L-arginina en concentraciones de 5 mM, mientras las restantes, se comportan de forma similar a la enzima silvestre (Sancho-Vaello et al., 2009; 2012). Por otra parte, la disminución de su longitud en uno o dos residuos (Q o EQ), provoca un aumento en la K_m para L-glutamato; pero, mientras la delección sencilla aumenta la actividad específica de la enzima en un 45 % al aumentar la V_{max} , la doble delección la disminuye en un 70 %. Estas mutaciones no alteran la inhibición por L-arginina (Sancho-Vaello et al., 2009). El corte del linker por medio de la inserción de un sitio específico reconocido por una proteasa, separa los dos dominios de la ArgA de *P. aeruginosa*, ocasionando un incremento de la K_m para L-glutamato. Lo anterior, sugiere fuertemente que la continuidad física a través del linker es crucial para dotar a la enzima con una afinidad que permita la reacción en concentraciones bajas del aminoácido (Sancho-Vaello et al., 2012).

En el lóbulo C-terminal se encuentra el dominio NAT, iniciando en el residuo 287 y termina en el 432, completando el monómero de la ArgA de *P. aeruginosa*. Este dominio alberga los sitios de unión para ambos sustratos y es miembro de la familia GCN5 acetiltransferasas (GNAT), cuya función es transferir el grupo acetyl de la acetyl-CoA a varios grupos amino (Shi et al., 2008). La secuencia de las proteínas de los miembros de la familia GNAT es altamente diversa con una similitud del 5 al 10 % (Shi et al., 2015). Este dominio puede ser aislado del resto de la proteína por el corte del péptido interdominio por sobreexpresión y purificación del mismo, mostrando actividad sintasa, pero con un incremento en la K_m para glutamato (25 veces más alto). El dominio por sí mismo es incapaz de formar estructuras hexaméricas (Sancho-Vaello et al., 2012) y además, al carecer de los sitios de unión a L-arginina es de esperarse que no sea inhibida (Shi et al., 2008).

2.3.3.2 LA ArgAB

La enzima ArgAB es bifuncional, ya que muestra tanto actividad sintasa como quinasa y fue descubierta en el orden de las Xanthomonadales de las γ -proteobacterias por su grado de

identidad con la ArgA de mamíferos (34 %). Por medio de ensayos de actividad se determinó que el L-glutamato no puede ser sustituido por otro aminoácido como aceptor del grupo acetil para la actividad sintasa (K_m de 2.8 mM), al igual que el ATP para la actividad cinasa (K_m de 1.3 mM). Similar a la ArgA, la enzima bifuncional también es inhibida por el producto final de la ruta biosintética, siendo el punto de regulación, para la cual se necesita de 0.2 mM y 5.1 mM de L-arginina para reducir el 50 % de la actividad sintasa y quinasa, respectivamente. Adicionalmente se sabe que el pH ideal para la actividad sintasa es de 9.0, mientras que para la actividad cinasa es de 6.0 (Qu et al., 2007).

La enzima en *X. campestris* está compuesta por unidades de 50 kDa, los cuales forman complejos tetraméricos. Estructuralmente la enzima está formada por dos α -hélices, un dominio AAK, un linker interdominio y un dominio NAT. Las dos α -hélices (residuos del 1 al 39) sirven de interfaz para la interacción entre dos dominios AAK de monómeros diferentes, además la W28 es un posible sitio de unión a L-arginina. En el lóbulo N-terminal está el dominio AAK (residuos del 20 al 290), el cual muestra una identidad del 26 % con la ArgB de *Thermotoga marítima*. Este dominio contiene los sitios conservados para la unión a el NAG, ATP y L-arginina, por lo tanto el mecanismo catalítico y de inhibición parecen ser similares a la ArgA. El residuo G291 forma el pequeño linker que une a los dominios. En el lóbulo C-terminal está el dominio NAT (residuos del 292 al 440) y cumple la misma función que en la ArgA (Shi et al., 2011).

2.3.3.3 LA Arg(A)

Estructuralmente estas enzimas contienen únicamente un dominio con actividad enzimática tipo sintasa y hasta la fecha se han descubierto cuatro tipos diferentes, con base en su secuencia de aminoácidos:

- a) En *Campylobacter jejuni* el gen *argO* codifica para una proteína de 146 aminoácidos y es capaz de restaurar el crecimiento en medio mínimo de una cepa mutante *argA* de *E. coli*. Su secuencia está relacionada a la familia GNAT pero no tiene similitud con el dominio NAT de la clásica ArgA (Hani et al, 1999).

- b) En *Corynebacterium glutamicum* el gen *cg3035* codifica para una proteína de 335 aminoácidos y puede restaurar el crecimiento en medio mínimo de una cepa mutante *argA* de *E. coli*, mostrando una función de complementación. Lo anterior fue respaldado por la reducción en el 31 % de NAG a nivel intracelular, en una cepa mutante *cg3035* de *C. glutamicum*. Adicionalmente ensayos de actividad sintasa para los extractos de dicha cepa muestran una reducción de la actividad específica del 45 % en comparación con la cepa silvestre. La actividad sintasa de los extractos no es inhibida por L-arginina o L-ornitina en concentraciones de 50 mM (Petri et al., 2013). Con base en su secuencia de aminoácidos se sabe que el dominio pertenece a la familia de GNAT y tiene baja identidad con la ArgA de *E. coli* (28 %), *B. subtilis* (29 %) y Arg(A) de *Mycobacterium tuberculosis* (29 %). Existen únicamente homólogos en el suborden *Corynebacterineae* por lo que se le a denominado C-Arg(A) (Petri et al., 2013).
- c) En *M. tuberculosis* existe un tipo de Arg(A) con un tamaño de 174 aminoácidos, dando como resultado 21 kDa. La proteína pertenece a la familia de las GNAT y puede existir en formas diméricas o tetraméricas. La enzima utiliza mejor L-glutamina que L-glutamato como sustrato (K_m de 600 mM y 320 mM, respectivamente), pero son valores altos comparados con la ArgA. Además la MtSNAG reduce su actividad en 50 % con 0.03 mM de L-arginina, aunque el mecanismo por el cual ocurre dicho proceso es desconocido, ya que carece de un dominio AAK con los sitios de unión al aminoácido (Errey y Blanchard, 2005).
- d) En *Moritella abyssi* Y *Moritella profunda* se descubrió que el gen *argH* tiene una extensión de 170 codones, el cual codifica para un domino GNAT. Éste gen fue denominado *argH(A)* y es capaz complementar tanto una cepa mutante *argA* como *argH* de *E. coli* (Xu et al., 2000). Posteriormente, por análisis bioinformáticos se determinó que esta nueva versión de Arg(A) se encuentra en el grupo de las *Alteromonas-Vibrio* (Xu et al., 2006).

2.3.4 N-ACETILGLUTAMATO QUINASA

La ArgB pertenece a la familia de las de las aminoácido quinasa (AAK), la cual comprende enzimas como la carbamato quinasa (CK, EC 2.7.2.2), la glutamato-5-quinasa (EC 2.7.2.11),

la UMP quinasa (UMPK, EC 2.7.4.22), aspartato quinasa (AK, 2.7.2.4) y la quinasa de resistencia a fosfomicina (FomA, EC 2.7.4.26) (Marcos et al., 2010). La enzima utiliza como sustratos de reacción el NAG y ATP, dando como producto el NAG-5-fosfato que es lábil (Friedrich y Magasanik, 1978; Friedrich et al., 1978). Existen dos tipos de ésta enzima: i) las que son inhibidas por L-arginina (ruta lineal) y ii) las que no lo son (ruta del reciclaje).

2.3.4.1 LA ArgB NO INHIBIDA POR L-ARGININA

La ArgB de *E. coli* fue la primera enzima en ser purificada parcialmente y algunas de sus propiedades bioquímicas fueron reveladas. Se sabe que el pH óptimo para la actividad enzimática va de 6.8 a 7.8 y necesita de un catión de Mg^{2+} para catalizar la reacción. Además, el NAG no puede ser sustituido por *N*-benzoilglutamato, L-glutamato ni D-glutamato y muestra una K_m de 6 mM. El ATP tiene una K_m de 1 mM y puede ser sustituido por GTP (Vogel y McLellan, 1970).

Estructuralmente la enzima está formada por 258 residuos, dando como resultado un monómero con un peso de 29 kDa, el cual forman complejos homodiméricos. Cada unidad está formada por 18 hojas β y ocho α -hélice, donde β_5 y α_C son de suma importancia en la formación de complejos diméricos a través de interacciones hidrofóbicas. El dominio AAK que compone a la enzima está dividido en dos regiones: el N y C-terminal. El lóbulo N-terminal comprende los residuos del 1 al 173 y cumple tres funciones: i) albergar tres sitios de unión al ATP; ii) los de unión al NAG y iii) servir como interfaz para la formación de los homodímeros. A partir del residuo 174 y hasta el 258 se forma el lóbulo C-terminal, en el cual se encuentra los seis sitios de unión al ATP (Ramón-Maiques et al., 2002).

2.3.4.2 LA ArgB INHIBIDA POR L-ARGININA

En muchas bacterias como *P. aeruginosa*, *T. marítima* y *Corynebacterium* sp. la enzima es inhibida por el producto final de la ruta y por lo tanto juega un papel central en el sistema de regulación. Ensayos de actividad con enzima purificada demostraron que la enzima requiere de Mg^{2+} para su activación, el cual puede ser reemplazado parcialmente por Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} y Ca^{2+} . El NAG muestra una K_m de 2.0 mM a 3.4 mM, y puede ser sustituido por *N*-

carbamiolglutamato, *N*-formilglutamato y *N*-acetil-D-glutamato, pero con menor eficiencia (15 %, 4 % y 3.5 % de actividad, respectivamente). La K_m para ATP es de 3 mM, el cual puede ser sustituido por el GTP, UTP o CTP, pero con menor actividad (16 %, 6 % y 4 %, respectivamente). Sin embargo, el dATP en concentraciones de 5 mM y 10 mM muestra ser un buen donador del grupo fosfato. La L-arginina afecta negativamente la actividad de la enzima y muestra valor de K_i de 0.4 mM a 0.7 mM, dependiendo de la especie analizada. Además del producto final de la ruta, la L-citrulina también ejerce un efecto negativo sobre la actividad enzimática, pero con menor impacto, ya que 1 mM y 2.5 mM únicamente reducen la actividad a un 91 % y 30 %. El ADP un subproducto derivado de la utilización del ATP también puede inhibir la actividad de la enzima hasta en 40 % en concentraciones de 1.2 mM (Fernández-Murga et al., 2004; Haas y Leisinger, 1975; Xu et al., 2012).

Estructuralmente la ArgB de *P. aeruginosa* está compuesta por 301 residuos dando como resultado monómeros de 29 kDa, los cuales forman oligómeros de seis unidades. Los primeros 25 residuos en el N-terminal forman una α -hélice, denominada N α -hélice, la cual está ausente en la ArgB de *E. coli*. Específicamente la región C-terminal de la α -hélice tiene dos funciones: i) conectar tres homodímeros para formar un complejo hexamérico y ii) albergar sitios de unión al inhibidor (Y21 y F25) (Ramón-Maiques et al., 2006). La mutación de Y21A trae como consecuencia el aumento en más de 50 veces la concentración de L-arginina necesaria para reducir un 50 % la actividad, mientras que R24E la reduce más de siete veces. La delección parcial de la α -hélice (Δ 2-16 y Δ 2-26) evita la formación de complejos hexaméricos y promueve la formación de dímeros con la misma actividad específica que la silvestre, pero aumenta la concentración de L-arginina necesaria para reducir su actividad a la mitad en 170 y 280 veces. El dominio AAK de la ArgB de *P. aeruginosa* es similar estructural y funcionalmente a la de *E. coli*, pero adicionalmente contiene sitios de unión a L-arginina (K213, T232, E284, I285, T287 y G292). Las mutaciones en K213A y G290 aumentan la concentración de L-arginina necesaria un 50 %, mientras que la H271N y E284D la incrementa diez y cuatro veces, respectivamente (Fernández-Murga y Rubio, 2008). En *Corynebacterium crenatum* se crearon cinco cepas con mutaciones puntuales en la enzima, con el objetivo de aumentar la producción de L-arginina. Las mutaciones en los residuos

E17R, H24E y H268N aumentan entre 50 a 60 veces la concentración de L-arginina necesaria para obtener 50 % de inhibición, mientras que la doble (H24E, H258N) y la triple mutación (E17R, H24E y H268N) aumentan dicha concentración hasta 875 y 1960 veces (Xu et al., 2012). Cómo los residuos E17 y H24 se están en la N α -hélice, y H259 en un loop entre las estructuras β 17 y α H, los cuales se ubican en la entrada del sitio de unión de L-arginina, su mutación trae consigo un cambio en la orientación de la N α -hélice, lo que impide la entrada del aminoácido (Xu et al., 2012).

2.3.5 LA N-ACETILORNITINA DESACETILASA

La ArgE pertenece a la familia de las peptidasas M20, cuyos miembros tienen dos iones catalíticos de Zn²⁺ en el sitio activo, unidos por una His/Asp, Asp, Glu, Asp/Glu e His. La enzima es homóloga de la carboxipeptidasa G2 (CPG2, EC 3.4.17.11), aminoacilasa 1 (ACY1, 3.5.1.14) y succinildiaminopimelato desuccinilasa (SDPD; EC 3.5.1.18) (Meinzel et al., 1992).

La ArgE de *E. coli* ha sido sobreexpresada y purificada con la finalidad de revelar sus propiedades bioquímicas y catalíticas. La enzima recombinante tiene una K_m para la NAO de 0.5 mM a 1.6 mM y la actividad es potenciada por el glutatión (GSH) y Co²⁺ cuando se agrega en concentraciones de 0.2 mM y 1 mM, respectivamente a pH de 7.0. El GSH no puede ser sustituido por tioglicolato, ascorbato e hidrosulfito como agente reductor. La enzima también puede utilizar Zn²⁺ como catión divalente, pero el Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ y Fe²⁺ no tienen algún efecto sobre la actividad; mientras que los de Cd²⁺ y Cu²⁺ la inhiben. En cuanto al sustrato, la ArgE de *E. coli* también puede catalizar la desacetilación de *N*-acetilalanina, *N*-acetilparagina, *N*-acetilcisteína, *N*-acetilglutamina, *N*-acetilleucina, *N*-acetilisina, *N*-acetilserina, *N*-acetilglutamato- γ -semialdehído, *N*-acetilmetionina y *N*-formilmetionina. La enzima es incapaz de hidrolizar los compuestos *N*-acetilados derivados de los aminoácidos aromáticos (Vogel y Bonner, 1956; Vogel y McLellan, 1971; Javid-Majd y Blanchard, 2000). También se sabe que la enzima contiene un sitio metaloactivo dinuclear de Zn²⁺ y presumiblemente uno de estos iones tiene funciones catalíticas y el otro estructurales (McGregor et al., 2005).

Estructuralmente la única ArgE que ha sido definida es la de *X. campestris*, la cual tiene un 25 % de identidad con la de *E. coli*. La enzima cuenta con 366 residuos por monómero, con un peso teórico de 38.8 kDa, los cuales pueden formar oligómeros de cuatro y ocho unidades. La enzima está formada por dos dominios: el catalítico y el de interfaz. El dominio catalítico comprende los residuos del 1 al 166 del N-terminal y del 286 al 366 del C-terminal; y es similar en otras exopeptidasas. Los residuos H72, D103 y E155 forman un sitio de unión a un ion de Co^{2+} y los residuos E131 y H340 otro (McGregor et al., 2013; Shi et al., 2007). En la ArgE de *E. coli* se ha mutado el residuo H355A (H340 en *X. campestris*) y no puede unir un segundo ion de Zn^{2+} , lo que trae como resultado la pérdida de actividad (McGregor et al., 2013). Los residuos E130, E131, A132, F277, F314, W315, I336 y H340 forman el sitio de unión al sustrato (Shi et al., 2007).

El dominio de interfaz comprende los residuos del 167 al 285 y su función es la de unir dos monómeros (Shi et al., 2007). Este dominio es topológicamente similar a las proteínas de unión a RNA como la fenilalanina-tRNA sintetasa (Mosyak et al., 1995) y acilfosfatasa (Saudek et al., 1989).

2.3.6 LA N-ORNITINA ACETILTRANSFERASA

La ArgJ pertenece a la superfamilia de las enzimas N-terminal nucleofilas (Ntn), cuyo mecanismo catalítico involucra un ataque nucleofílico al grupo carbonilo de un enlace amida utilizando la cadena lateral de una treonina, serina o cisteína en el N-terminal (Elkins et al., 2005). La ArgJ está relacionada evolucionariamente con la L-aminopeptidasa D-Ala-esterasa/amidasa (DmpA, EC:3.4.11.19), por lo que muestran similitud a nivel de secuencia, estructura y función (Cheng y Grishin, 2005).

Las ArgJs que pueden únicamente transacetilar al L-glutamato a partir de NAO en una reacción reversible son denominadas monofuncionales; mientras que las bifuncionales además de la reacción anterior, también sintetizan NAG de *nov*o, a partir de acetil-CoA y L-glutamato, en una reacción irreversible (Marc et al., 2000). A nivel de secuencia no es posible determinar si una ArgJ es mono o bifuncional, cómo se puede observar en el árbol filogenético creado por Xu et al. (2007), donde ambos tipos de enzimas comparten una

misma rama del árbol (Figura 4). Esto ha llevado a realizar en ensayos enzimáticos y/o de complementación para determinar que *Thermus thermophilus* (Baetens et al., 1998), *Streptomyces coelicolor* (Hindle et al., 1994), *Streptomyces clavuligerus* (Rodríguez-García et al., 2000), *Corynebacterium glutamicum* (Sakanyan et al., 1993), *P. aeruginosa* (Haas et al., 1977) y *M. tuberculosis* (Sankaranarayanan et al., 2010) presentan enzimas monofuncionales; mientras que *Geobacillus stearothermophilus* (Marc et al., 2000; Sakanyan et al., 1992; 1993), *Neisseria gonorrhoeae* (Picard y Dillon, 1989; Martin y Mulks, 1992), *B. subtilis* (O'Reilly y Devine., 1994), *T. marítima* (Van De Castele et al., 1990) y *Thermotoga neapolitana* (Marc et al., 2000) presentan enzimas bifuncionales.

Figura 4. Árbol filogenético de las ArgJs caracterizadas experimentalmente en bacterias. Las letras **B** y **M**, se refieren a enzimas bifuncionales y monofuncionales, respectivamente; mientras que el signo de **?**, significa que no ha sido caracterizada. Cg: *C. glutamicum*; Sco: *S. coelicolor*; Mt: *M. tuberculosis*; Scl: *S. clavuligerus*; Tt: *T. thermophilus*; Tm: *T. marítima*; Tn: *T. neapolitana*; Gs: *G. stearothermophilus*; Bs: *B. subtilis*; Sm: *S. meliloti*; Ng: *N. gonorrhoeae*; Pa: *P. aeruginosa* (modificado de Xu et al., 2007).

La ArgJs difieren en sus constantes catalíticas de acuerdo a la especie y las condiciones del ensayo, por lo que la K_m para NAO oscila entre 0.4 mM y 8.1 mM, mientras que para el L-glutamato puede ir de 19.2 mM a 28 mM (Marc et al., 2000). La enzima no puede utilizar como aceptores del grupo acetyl D-glutamato, L-aspartato, D-aspartato, L- α -ácido aminoadípico, L-leucina o L-alanina; pero si L-glutamina, L-arginina y L-lisina (Kershaw et al., 2002). En el caso de las enzimas bifuncionales la K_m para acetyl-CoA va de 0.9 mM a 7.7 mM, dependiendo de la especie analizada (Marc et al., 2000). La enzima no es inhibida por L-

arginina en concentraciones fisiológicas (0.01 a 4 mM), pero sí por L-ornitina en concentraciones de 0.02 mM a 2.3 mM, reduciendo su actividad hasta un 50 % (Sakanyan et al., 1993; 1996).

Existen dos estructuras cristalográficas reportadas para la ArgJ, una es de *S. clavuligerus* y la otra de *M. tuberculosis*. La de *M. tuberculosis* consta de 404 residuos y es sintetizada como una proteína precursora que dirige un corte autoproteolítico entre los residuo de L-alanina y L-treonina de un motivo conservado (ATML), para formar una enzima madura (Sakanyan et al., 1993). Después de dicho procesamiento la enzima consiste de dos cadenas: i) la cadena A, la cual comprende los residuos del 1 al 199 y forma la subunidad α ; y ii) la cadena B, la cual comprende los residuos del 200 al 404 y forma la subunidad β . Con base en lo anterior puede decirse que la ArgJ es formalmente un heterodímero y que en solución forma heterotetrámeros ($2\alpha 2\beta$). Por otra parte, estas unidades no definen un dominio funcional, por lo que el primer domino está formado por los residuos del 1 al 284 y el segundo del 285 al 404. La interacción entre el dominio uno de un monómero y el domino dos de otro forman una región que sirve de interfaz molecular, para la formación de heterotetrámeros, lo que a su vez define una cavidad que funciona como sitio de unión los sustratos, conformada por los residuos T122 al G123, T169, K189, M193, T200, E280, N399 y S404. La mutación del residuo T200A evita que la proteína pueda realizar el procedimiento de autoproteólisis, lo que origina que dicho residuo no se oriente correctamente en la cavidad de unión al sustrato (Elkins et al., 2005). En *G. stearothermophilus* se reemplazó el residuo T197 (T200 en *M. tuberculosis*) por S, C y G. Los resultados demostraron que T197G es incapaz de realizar el corte autoproteolítico y de mostrar actividad enzimática. Además las sustituciones de T197S y T197C si pueden formar la proteína madura, pero de forma menos eficiente, lo que trae como consecuencia la reducción de la actividad enzimática. También se demostró que ninguna de las tres sustituciones son funcionales *in vivo*, ya que no pueden restablecer el crecimiento de una cepa mutante de *E. coli* $\Delta argA$ ni $\Delta argE$ (Marc et al., 2001).

2.3.7 EL GEN *hipO*

El gen *hipO* codifica para una enzima que hidroliza el *N*-benzoilglicina en ácido benzoico y glicina (EC 3.5.1.32). Esta proteína pertenecen a la familia de las peptidasas M20 similar a la ArgE y su actividad aminoacilasa (3.5.1.14) ha sido caracterizada en *Pseudomonas putida* (Miyagawa et al., 1985) y *C. jejuni* (Steele et al., 2006). En la última especie se ha demostrado que dichos genes pueden complementar tanto una cepa de *E. coli* mutante *argA* como *argE*, sin ser homólogos de los genes *argA*, *argE* o *argJ*. Es decir, la proteína codificada por el gen *hipO* puede desacetilar un compuesto como acetil-CoA o NAO, para formar NAG en presencia de L-glutamato (Hani et al., 1999). Ensayos con la enzima sobreexpresada y purificada, demostraron que no puede usar NAO como sustrato, pero en dicho trabajo no se utilizó L-glutamato como sustrato aceptor del grupo acetilo, que podría ser necesario para su actividad (Steele et al., 2006).

2.3.8 REGULACIÓN GENÉTICA

La regulación de la expresión genética de la vía de biosíntesis de L-arginina en *E. coli* ha sido un modelo de estudio con alto nivel de complejidad. Además, la ocurrencia de un intermediario en común con la biosíntesis de pirimidinas (el carbamoil fosfato) planteó muy temprano la cuestión de la regulación de la transcripción en puntos ramificados de la ruta metabólica. A partir de estos descubrimientos, la regulación de la biosíntesis de L-arginina ha sido estudiada a detalle en una gran variedad de procariontes y unos pocos microorganismos eucariontes (Xu et al., 2003).

La ruta metabólica de la L-arginina es esencial para varios organismos y estrictamente controlada por el represor de L-arginina (ArgR) en bacterias. La proteína ArgR no solamente controla la transcripción del regulón involucrado en la biosíntesis de L-arginina (Maas, 1994), sino también la activación de rutas catabólicas como la arginasa (Gardan et al., 1995), arginina deiminasa (Maghnouj et al., 1998) y succinil transferasa (Lu et al., 1992). La ArgR se une a una secuencia conservada de DNA denominada caja ARG en la región del promotor, tanto de los genes involucrados en la biosíntesis como el catabolismo en presencia de altas concentraciones del aminoácido (Charlier et al., 1992).

Existen dos tipos de ArgR con base en la secuencia de aminoácidos y el tipo de plegamiento que presentan: i) ArgR/AhrC presente en enterobacterias y el género *Bacillus* y ii) ArgR encontrada en *Pseudomonas*.

2.3.8.1 REGULADOR ArgR/AhrC DE ENTEROBACTERIAS Y *Bacillus*.

Los estudios sobre la biosíntesis de L-arginina en *E. coli*, dieron origen al concepto de regulación (un conjunto de genes estructurales controlados por un regulador común de la transcripción). El represor ArgR en *E. coli* controla la expresión génica por exclusión estérica de la RNA polimerasa al unirse al operador, que contiene las cajas ARG y que traslapa con elementos del promotor (Maas y Clark, 1964; Maas et al., 1964; Maas, 1994).

La estructura de cristal de homólogos de ArgR en diferentes especies de bacterias incluyendo *E. coli*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *M. tuberculosis* y *Vibrio vulnificus* han sido determinadas (Van Duyne et al., 1996; Dennis et al., 2002; Ni et al., 1999; Cherney et al., 2009). La estructura de ArgR en complejo con el operador de DNA ha sido determinada en *M. tuberculosis* y *B. stearothermophilus* (Cherney et al., 2009; 2010; Garnett et al., 2008).

Los datos estructurales de la longitud total de ArgR de *B. stearothermophilus* dieron la primera vista de una proteína intacta, lo que contribuyó a entender las diferencias observadas en la organización cuaternaria de cada subunidad en la forma apo y unida a L-arginina (Ni et al., 1999; Song et al., 2002).

Los monómeros de ArgR consisten de dos dominios conservados separados por un linker accesible a una proteasa; el dominio N-terminal está clasificado como wHTH de unión al DNA y el dominio C-terminal responsable para la oligomerización y unión a L-arginina (Czaplewski et al., 1992; Sunnerhagen et al., 1997). Cada monómero de ArgR se ensambla en trímeros o hexámeros, lo que depende de la concentración de proteína y la presencia del corepresor L-arginina. Existen seis moléculas de L-arginina localizadas en la interfaz entre los dos trímeros de ArgR hexamérica, lo que facilita la formación de un dímero de trímeros (Van Duyne et al., 1996; Song et al., 2002). Los dos dominios N-terminal adyacentes de un hexámero interactúan con la caja ARG, la cual consta de un par de secuencias palindrómicas ligeramente imperfectas separadas por 3 pb. La secuencia consenso fue descrita como

TNTGAATWWWATTTCANW en *E. coli*, CATGAATAAAAATKCAAK en *B. subtilis* y AWTGCATRWWYATGCAWT en *Streptomyces* (donde W= A o T, K= G o T, R= A o G, Y= T o C, M= A o C, N= alguna base) (Wang et al., 1998; Miller et al., 1997; Rodríguez-García et al., 1997).

En el caso de *E. coli*, la ArgR existe principalmente en estado hexamérico en presencia o ausencia de L-arginina (Lim et al., 1987), mientras que en *B. subtilis* y *B. stearothermophilus* la proteína ha sido purificada principalmente como trímero (Ni et al., 1999; Dion et al., 1997; Dimova et al., 2000), pero pueden formar hexámeros en concentraciones altas de la proteína y en presencia de L-arginina (Holtham et al., 1999).

Las proteínas ArgR de las bacterias pueden ser clasificadas en tres clases con base en la dependencia de la L-arginina y especificidad de las cajas ARG (Morin et al., 2003). La clase I se une al operador que contiene la caja ARG de manera altamente dependiente tanto de L-arginina como de la secuencia específica. Estas proteínas existen principalmente como hexámeros aun en bajas concentraciones de proteína y la ausencia de L-arginina e incluye a proteínas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* (Lu et al., 1992; Charlier et al., 1992; Lim et al., 1987; Xu et al., 2003). La clase II involucra a bacterias Gram positivas como *Bacillus* y *Streptomyces*, la cual existe en equilibrio entre estados triméricos y hexaméricos y promueven la transición de trímeros a hexámeros en presencia de altas concentraciones de proteína y/o la presencia de L-arginina. Esta clase muestra menor especificidad a la secuencia de DNA y su unión es moderadamente dependiente de L-arginina (Dennis et al., 2002; Ni et al., 1999; Dion et al., 1997; Ghochikyan et al., 2002). Las proteínas de *T. neapolitana* y *T. maritima* pertenecen a la clase III, la cual puede interactuar con operadores heterólogos, que tiene la secuencia de la caja ARG mostrando pobre especificidad y su unión al DNA es marginalmente influenciada por L-arginina (Morin et al., 2003).

2.3.8.2 REGULADOR ArgR DE *Pseudomonas*.

En *P. aeruginosa* la transcripción de sólo dos genes y un operon involucrados en la biosíntesis de L-arginina es reprimida por el aminoácido: *argF*, *carAB* y *argG* (Kwon et al., 1994, Lu et al., 2004). Por lo tanto, la biosíntesis de L-ornitina no es reprimida por el producto final de la

ruta, sino por si misma. La represión está mediada por una proteína reguladora ArgR que no está relacionada con ArgR/AhrC, tanto funcional como estructuralmente (Park et al., 1997). La proteína es un dímero que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS y posee dos dominios HTH (haz tetrahelico) de unión al ADN en el extremo C-terminal de cada subunidad. Ensayos *in vitro* han demostrado que ArgR no aumenta su afinidad a sus sitios de unión en presencia de L-arginina, pero la proteína es autoinducida por el promotor del operón al cual pertenece y responde a concentraciones de 20mM de L-arginina (Nishijyo et al., 1998).

2.3.9 BIOSÍNTESIS DE L-ARGININA EN LAS RHIZOBIAS

Las rhizobias son microorganismos que pertenecen a las clases α y β -proteobacterias, que se caracterizan por establecer relaciones simbióticas con plantas leguminosas (Masson-Boivin et al., 2009). Esta asociación le permita a la bacteria realizar la fijación biológica del dinitrógeno atmosférico en un órgano especializado de la planta denominado nódulo. Entre la alfalfa (*Medicago sativa*) y *S. meliloti*, el proceso de nodulación comienza cuando la planta secreta el flavonoide (2-fenil-4-pirona) reconocido por la bacteria, que promueve la síntesis y secreción de los factores de nodulación (lipoquitooligosacaridos). Dichos factores activan múltiples respuestas en la leguminosa que la preparan para la invasión de la rhizobia. Los factores de nodulación en conjunto con los exopolisacárido simbióticos (succinoglicano y galactoglucano) inducen la formación del pelo de infección, el cual es un tubo delgado en cuyo interior se encuentran las bacterias y que penetra el tejido cortical de la planta, liberando al microorganismo en su célula objetivo. Las células del interior del cortex de la planta envuelven a la bacteria en una membrana que posteriormente madura en una estructura denominada simbiosoma. El microorganismo internalizado en dicha estructura se diferencia a su forma de bacteroide para realizar el proceso de fijación de nitrógeno (Jones et al., 2007). Las plantas reciben el nitrógeno fijado por la bacteria en forma de amonio (NH_4^+), el cual es incorporado en forma orgánica antes de ser exportado del nódulo; a cambio la bacteria simbiótica es protegida del estrés ambiental y suplementada con una fuente de carbono como los ácidos dicarboxílicos (Udvardi y Poole, 2013).

Uno de los factores que influye en el establecimiento de una relación simbiótica efectiva es el metabolismo de los aminoácidos (Dunn, 2015). Randhawa y Hassani (2002), mencionan que la disponibilidad de los 22 aminoácidos es crucial para el desarrollo de nódulos efectivos; los cuales pueden ser provistos por la raíz del hospedero o sintetizados por la bacteria.

El estudio de la biosíntesis de L-arginina en este grupo de bacterias ha sido analizada por medio de la mutación del gen *argC* en *Rhizobium etli* (Ferraioli et al., 2001) y *S. meliloti* (Díaz et al., 2011), causando auxotrofía. En *R. etli* la mutación se realizó por medio del transposon *Tn5* y cuando dicha cepa es inoculada en plantas de *Phaseolus vulgaris* es incapaz de inducir la formación de nódulos en la raíz como consecuencia de su incapacidad para sintetizar los factores de nodulación. Esta condición puede ser restaurada parcialmente por la adición de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de L-arginina (Ferraioli et al., 2001). Por otro lado, la mutación del *argE* en la misma bacteria no provoca auxotrofía y ensayos de nodulación y fijación de nitrógeno no se han reportado (Villaseñor et al., 2011).

Cepas auxotrofas para la síntesis de L-arginina en *S. meliloti* han sido generadas utilizando ácido nitroso. Un conjunto de cepas únicamente puede crecer cuando se suplementa el medio mínimo con NAO, pero no con NAG; por lo que se asume que la mutación recae en el *argB*, *argC* o *argD*. Otras cepas únicamente crecen cuando se adiciona en el medio L-citrulina y uracilo, por lo que la mutación puede ser en el gen *carA* o *carB* (carbamoil fosfato sintasa). Adicionalmente existen otras cepas que únicamente crecen cuando se les adiciona L-citrulina al medio, pero no cuando se adiciona L-ornitina, por lo que se asume que la mutación está en el gen *argF*. Por último, existe una posible mutante en el gen *argG*, ya que únicamente crece cuando se adiciona arginosuccinato al medio, pero no cuando el suplemento es L-citrulina. Las dos últimas mutantes muestran un fenotipo simbiótico, mientras que las anteriores no (Kerppola y Kahn, 1988a; 1988b).

En *S. meliloti* mutaciones con el transposon *Tn5* probablemente en los genes del *argA* al *argE* son auxotrofas en L-ornitina. Dichas cepas forman nódulos blancos, de forma esférica y localizados en las raíces laterales principalmente, cuando son inoculadas en plantas de *Medicago sativa*. Con base en la cantidad de biomasa generada por plantas inoculadas con estas cepas, que es similar a las plantas sin inocular y representan solamente el 20 % respecto

a las plantas inoculadas con la cepa silvestre, se puede decir que dichos nódulos no son funcionales. Por otra parte, las cepas mutantes auxotrofas en L-arginina que corresponde a los genes *argF*, *argG* y *argH* (después de la síntesis de L-ornitina), inducen la formación de nódulos rosas y cilíndricos, tanto en la raíz principal como en laterales, los cuales son similares a los inducidos por la cepa silvestre. El peso seco de las plantas inoculadas con estas cepas es similar a la silvestre, por lo que se asume que los nódulos son funcionales. Cabe mencionar que las mutaciones no fueron analizadas a nivel molecular y que las mutaciones en cada uno de los genes se determinó con base en la restauración del fenotipo silvestre utilizando L-ornitina o L-arginina (Kumar et al., 2003). La diferencia entre las cepas auxotrofas para L-ornitina y L-arginina en cuanto a su capacidad de fijar nitrógeno cuando se asocian con *M. sativa*, radica en que los bacteroides auxotrofos para L-ornitina no se desarrollan completamente, ya que tienen una forma esférica u oval, cuando deberían ser mas elongados, cosa que si sucede en los auxotrofos para L-arginina (Kumar et al., 2003). Además, L-ornitina es un precursor de poliaminas, las cuales cumplen diversas funciones a nivel celular (Dunn, 2015).

Recientemente diCenzo y Finan (2015) construyeron una cepa de *S. meliloti* Δ pSymAB y a través de mutagénesis al azar utilizando el transposón Tn5-B20 descubrieron que el gen *argH* existe tanto en el cromosoma como en el pSymB y además, que probablemente el *argD* o *argF* también tienen una copia en el plásmido. Por otra parte, en *Mesorhizobium loti* la mutación del gen *argF* utilizando la metodología mencionada, provoca la auxotrofia en la bacteria. Cuando la cepa es inoculada en plantas de *Lotus japonicus* se forma el tubo de infección, pero los nódulos formados son pequeños, blancos y no soportan el crecimiento de la planta en un medio libre de nitrógeno. Lo anterior se debe probablemente al bajo número de células infectadas en dichos nódulos. La restauración del fenotipo fijador de nitrógeno se logra por la adición de 0.02 mM de L-citrulina o L-arginina en el medio (Mishima et al., 2008). Con base en lo expuesto, se ha llegado a la conclusión de que la biosíntesis de L-arginina afecta de modo distinto cada una de las relaciones simbióticas y cuando menos en la interacción entre *S. meliloti* y *M. Sativa*, es de crucial importancia la síntesis de L-ornitina más que de L-arginina (Dunn, 2015; Kumar et al., 2003).

2.3.10 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La rhizobia *S. meliloti* Rm1021 pertenece a la clase α -proteobacteria, que puede asociarse con plantas del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*; para realizar la reducción biológica de dinitrógeno atmosférico (N_2). El genoma tripartita del microsimbionte es de 6.7 Mb y comprende un cromosoma (3.65 Mb) y dos megaplásmidos (pSymA de 1.35 Mb y pSymB de 1.68 Mb) (Galibert et al., 2001; Barnett et al., 2001; Capela et al., 2001; Finan et al., 2001). En el cromosoma se encuentran anotados nueve genes necesarios para la biosíntesis de L-arginina (*argB*, *argC*, *argDF*, *argG*, *argH*, *argJ* y *carAB*), excepto una *argA* y además, también están los genes *hipO* (*smc00682* y *smc02256*). Por otra parte, en el pSymA se encuentra un gen anotado como *argE* (*sma1836*) y un homólogo de los genes *hipO* (*smb21279*). Debido a esto, es importante determinar si existe un ArgA, si ArgJ es mono o bifuncional y si la síntesis de L-ornitina a partir de NAO es realizada únicamente por ArgJ o ArgE o ambos, y si las proteínas HipO también participan en la síntesis del intermediario. Además, la regulación a nivel genético, tanto del anabolismos como del catabolismo de la L-arginina es desconocido, ya que hasta la fecha no se ha encontrado un homólogo para las dos formas alternativas de ArgR. Esta situación no es específica de *S. meliloti*, ya que se extiende a toda las rhizobias con algunas diferencias.

Dado el desconocimiento actual sobre la biosíntesis de la L-arginina en este grupo de bacterias, proponemos un estudio de genómica funcional de la biosíntesis del aminoácido, utilizando a *S. meliloti* como modelo, lo que contribuirá en el entendimiento del proceso de síntesis y su regulación; considerando de antemano que las relaciones simbióticas son afectadas de forma distinta durante la biosíntesis de L-arginina.

3. HIPÓTESIS

- a) La ArgJ es bifuncional.
- b) No existe una Arg(A).
- c) La ArgB es inhibida por L-arginina y es el punto de regulación del flujo metabólico a nivel bioquímico.
- d) La ArgE no es funcional.
- e) Las HipOs no participan en la síntesis de L-ornitina.
- f) No existe regulación a nivel genético en la ruta metabólica.

4. OBJETIVO

4.1 GENERAL

Caracterizar bioquímica y genéticamente la regulación de la biosíntesis de L-arginina en *S. meliloti* Rm1021.

4.1.1 ESPECÍFICOS

- a) Determinar si la ArgJ es bifuncional por medio de ensayos enzimáticos y complementación heteróloga.
- b) Identificar el gen que codifica para la enzima que sintetiza NAG a través de ensayos enzimáticos y complementación heteróloga.
- c) Determinar si la ArgB es inhibida por L-arginina por medio de ensayos enzimáticos.
- d) Determinar si la ArgE es funcional por medio de ensayos enzimáticos y complementación heteróloga.
- e) Determinar si las HipO sintetizan L-ornitina por medio de ensayos enzimáticos.
- f) Determinar si los genes *argB*, *argE* y *argJ* son regulados a nivel genético a través de fusiones transcripcionales.

4. METODOLOGÍA

En este apartado únicamente se describirán los métodos no incluidos en el artículo publicado (Hernández et al., 2015).

4.1 MEDIOS DE CULTIVO

El medio LB contenía 0.5 % de extracto de levadura, 1 % de NaCl y 1 % de triptona. El medio mínimo M9 (MM9) estaba compuesto de 2 mM de MgSO₄, 0.1 mM de CaCl₂, 0.4 % de glucosa y 1X de sales M9. Las sales M9 5X contenía 240 mM de Na₂HPO₄·7H₂O, 110 mM de KH₂PO₄, 42.8 mM de NaCl y 93.5 mM de NH₄Cl. El medio mínimo succinato-amonio (MSA) estaba formado por 0.8 mM de MgSO₄, 1.3 mM K₂HPO₄, 11.4 mM de ácido succínico, 2 mM de CaCl₂, 9.9 mM de NH₄Cl y 0.02 mM de FeCl₃·6H₂O (Dunn et al., 2001).

4.2 IDENTIFICACIÓN DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA ENZIMA QUE SINTETIZA EL NAG.

Para la búsqueda del gen se utilizaron tres estrategias, las cuales se describen en los siguientes apartados.

4.2.1 MUTAGÉNESIS AL AZAR

Las cepas enlistadas en el Cuadro 2 fueron inoculadas en 5 mL de medio líquido LB sin antibióticos y crecidas a 30 °C durante 16 h; y posteriormente fueron recuperadas por centrifugación a 3000 x g durante 5 min. Las células obtenidas fueron resuspendidas en 5 mL de LB y centrifugadas como se mencionó para recuperarlas nuevamente. Los cultivos fueron ajustados a una DO₆₂₀ de 0.3 para realizar una cruce triparental en medio LB sólido sin antibióticos. La cruce se realizó utilizando 300 µL de la cepa receptora, 150 µL de la donadora y 75 µL de la cepa que contenía el plásmido ayudante. Después de 16 h de incubación a 30° C, la cruce fue levantada y las células fueron resuspendidas en medio LB líquido sin antibióticos, ajustando la DO₆₂₀ a 0.5. A partir de la DO₆₂₀ mencionada, se realizaron diferentes diluciones del cultivo en el rango de 10⁻¹ hasta 10⁻⁸, que posteriormente se plaquearon en medio LB sólido con 20 ng µL⁻¹ de NaI, 200 ng µL⁻¹ de Sm y 60 ng µL⁻¹ de Neo. Después de 5 días de incubación a 30° C, las colonias resultantes fueron colocadas en MSA

sólido con y sin 1 mM de L-arginina e incubadas a la temperatura mencionada. Las colonias que no crecieron en el medio sin suplementar pero sí en el suplementado fueron seleccionadas e inoculadas en medio MSA con y sin 1 mM de NAG, NAO o L-citrulina bajo las condiciones descritas.

Cuadro 2. Cepas y plásmidos utilizados en la mutagénesis al azar.

Cepa	Plásmido	Características	Referencias
<i>S. meliloti</i> Rm1021		Nal ^r , Sm ^r	Meade et al. (1982)
<i>E. coli</i> DH5α	pUT	Nal ^r , Ap ^r , Neo ^r mini-Tn5/ <i>lacZ</i> I	Herrero et al. (1990) de Lorenzo et al. (1990)
<i>E. coli</i> DH5α	pRK2073	Nal ^r , Sp ^r	Yakobsone y Guiney (1984)

^r Resistencia a antibióticos

4.2.2 COMPLEMENTACIÓN CON UN BANCO DE CÓSMIDOS

Las cepas enlistadas en el Cuadro 3 fueron inoculadas en 2 mL de medio líquido LB sin antibióticos y crecidas a 37 °C durante 8 h. Posteriormente, se realizó y levantó la crucea triparental como se describió. Después de hacer las diluciones del cultivo proveniente de la crucea (desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸), fueron plaqueadas en medio LB sólido que contenía 30 ng μL⁻¹ de Km y 10 ng μL⁻¹ de Tc. Las células resultantes fueron colocadas en MM9 a 37 °C durante 5 días.

Cuadro 3. Cepas y plásmidos utilizados en el ensayo de complementación de la cepa de *E. coli* MC4100 Δ*argA* con un banco de cósmidos de *S. meliloti*.

Cepa	Plásmido	Características	Referencias
<i>E. coli</i> MC4100 Δ <i>argA</i> ::Km		Km ^r , Sm ^r	Hernández et al. (2015)
<i>E. coli</i> H101	pLAFR3	Sm ^r , Tc ^r	Sohlenkamp et al. (2000)
<i>E. coli</i> DH5α	pRK2073	Nal ^r , Sp ^r	Yakobsone y Guiney (1984)

^r Resistencia al antibióticos

4.2.3 ENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA ArgA

La cepa de *S. meliloti* fue inoculada en 2 mL de medio LB líquido con 20 ng μL⁻¹ de Nal y 200 ng μL⁻¹ de Sm durante 24 h a 30° C. Posteriormente, se tomaron 500 μL del cultivo para inocular 50 mL del mismo medio, pero con 10 ng μL⁻¹ de Nal y 100 ng μL⁻¹ de Sm. Después

de 24 h de crecimiento a 30 °C las células fueron recuperadas por centrifugación como se describió y resuspendidas en 50 mL de MSA. Lo anterior se repitió una vez más y finalmente las células fueron resuspendidas en 10 mL del mismo medio. Estas células fueron utilizadas para inocular 1 L de MSA a una DO_{620} de 0.05 y crecidas bajo las condiciones mencionadas. El cultivo fue recobrado por centrifugación a $10,000 \times g$ durante 5 min a 4 °C y resuspendido en 25 mL del buffer fosfato salino (PBS) al 1X. Lo anterior se realizó una vez más y finalmente las células fueron resuspendidas en 3 mL del buffer. Posteriormente las bacterias fueron lisadas por sonicación con pulsos de 15 s en 15 micrones de amplitud durante 2 min (MSE Soniprep 150; Sanyo Gallenkamp, Loughborough, UK). El lisado fue centrifugado a $9000 \times g$ durante 30 min a 4 °C y la fracción soluble fue utilizada para realizar el ensayo enzimático después de determinar la concentración de la proteína por el método de Bradford (1976).

La reacción enzimática se realizó en un volumen final de 50 μ L, la cual contenía 5 mM de L-glutamato a pH 9.0, 0.25 μ Ci de L-[3,4- 3 H]-glutamato con actividad específica de 47.5 μ Ci mmol^{-1} , 2.1 mM de acetil-CoA, 100 mM de Tris HCl pH 9.0 y 0.2 mg de proteína. La reacción se incubó a 30 °C a diferentes tiempos y fue terminada por la adición de 100 μ L de 0.2 M de HCl. El NAG fue purificado en una columna por cromatografía de intercambio iónico, utilizando 600 μ L de la resina Dowex 50-W colocada en una punta azul de 1 mL. La columna fue equilibrada con 1 mL de 0.1 M de HCl y posteriormente se colocaron 100 μ L de la mezcla de reacción, que fueron eluidos con 1 mL de HCl a 0.1 M. El afluente total fue colectado en un vial que contenía 10 mL de Ultima Gold™ LSC Cocktail de Perkin Elmer, Inc. La radioactividad fue determinada por el LS 6500 Programmable Scintillation Counter Beckman Coulter, Inc. (CA, USA)(Haas et al., 1972).

4.3 ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LAS ArgJs

El árbol filogenético de las ArgJs se realizó con base en el alineamiento de Clustal omega (Sievers y Higgins, 2014) y utilizando el método de agrupamiento de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987).

4.3 MODELADO DE HipO1

El modelo de la proteína HipO1 de *S. meliloti* fue construido en el servidor de I-TASSER (Yang y Zhang, 2015), utilizando como templado la proteína YexP de *B. subtilis* (Minasov et al., 2005).

4.3 SIMILITUD ESTRUCTURAL

La similitud estructural entre la estructura cristalográfica de la ArgE de *X. campestris* y el modelo de HipO1 de *S. meliloti* fue determinado mediante el algoritmo TM-align (Zhang, 2005). Las dos estructuras fueron superpuestas mediante el programa Chimera (Pettersen et al., 2004).

5. RESULTADOS

En esta sección se detallan los resultados no publicados y se realiza un resumen de los contenidos en el artículo (Hernández et al., 2015).

5.1 LA ArgJ ES MONOFUNCIONAL.

La ArgJ de *S. meliloti* (SMc02450) es una proteína con 413 residuos, con un peso molecular aproximado de 42.9 kDa y un pI de 5.0; con base en los cálculos realizados en el servidor de ExPASy (Gasteiger et al., 2003). Estructuralmente la ArgJ de *S. meliloti* presentó el motivo ATML de autoproteólisis (Figura 5), por lo que dirige un corte entre los residuos de Ala199 y Thr200, lo que generó dos péptidos con un peso molecular de 23 y 25 kDa cuando fue purificada (Cuadro 3, Hernández et al., 2015).

Basados en la estructura cristalográfica de la ArgJ de *S. clavuligerus* (Elkins et al., 2005) y el alineamiento de la secuencia de aminoácidos realizado, se determinó que en el dominio uno están los sitios de unión para el grupo acetilo de la NAO (Thr122 y Gly123) y algunos a L-ornitina (Thr169, Lys189, Met193, Thr200 y Glu280), los cuales resultaron ser idénticos en todas las ArgJs analizadas experimentalmente. Mientras que en el segundo dominio están los sitios restantes de unión a L-ornitina (Asn399 y Ser404), siendo estos últimos en conjunto con Glu280, los de unión al grupo carboxilo del L-glutamato (Figura 5).

A nivel cuaternario la enzima formó heterotetrámeros con un peso de 88 kDa (Cuadro 3 del artículo), donde los puentes de hidrógeno son el principal tipo de enlace para su formación, basados en la ArgJ de *S. clavuligerus* (Elkins et al., 2005).

La ArgJ de *S. meliloti* utilizó como sustratos la NAO y L-glutamato con una K_m de 2.1 ± 0.3 mM y 8.2 ± 0.7 mM, respectivamente; con una V_{max} de 2154 ± 0.2 nmol de L-ornitina min^{-1} mg proteína $^{-1}$. La enzima fue incapaz de utilizar acetyl-CoA como donador del grupo acetilo bajo las condiciones usadas en el ensayo, lo que sugiere que es una enzima monofuncional. Lo anterior fue corroborado por ensayos de complementación heteróloga, utilizando la construcción pBB5-argJ, donde únicamente restauró el crecimiento en MM9 de una cepa de *E. coli* BL21 (DE3) mutante *argE*, pero no la de una mutante *argA* de *E. coli* MC4100

(Hernández et al., 2015). Bajo las condiciones del ensayo utilizando la L-arginina, L-ornitina y L-citrulina como inhibidores de la actividad, se demostró que únicamente el segundo fue un inhibir en concentraciones fisiológicas (2.3 mM).

Figura 5. Alineamiento de las secuencias de las ArgJs caracterizadas previamente, en conjunto con la ArgJ de *S. meliloti*. En la parte superior con flechas de color naranja se representa las estructuras secundarias β -laminar y con rectángulos en magenta las α -hélices. Los residuos con fondo de color rojo indican los sitios de unión a L-ornitina y en amarillo al grupo acetilo de la NAO (Elkins et al., 2005). En la parte inferior con puntos de color turquesa se indican los residuos de unión al grupo carboxilo del L-glutamato y naranja los residuos que ha sido mutados (Elkins et al., 2005; Marc et al., 2001). Los residuos en color azul indican el motivo conservado de autoproteólisis (Sakanyan et al., 1993). Cg: *C. glutamicum*; Sco: *S. coelicolor*; Mt: *M. tuberculosis*; Scl: *S. clavuligerus*; Tt: *T. thermophilus*; Tm: *T. marítima*; Tn: *T. neapolitana*; Gs: *G. stearothermophilus*; Bs: *B. subtilis*; Sm: *S. meliloti*; Ng: *N. gonorrhoeae*; Pa: *P. aeruginosa*.

A nivel genético la mutación de la *argJ* no mostró un efecto sobre el crecimiento de la bacteria en MSA, siendo similar a la cepa silvestre (Figura 2a del artículo), probablemente por la existencia de los genes *argE* y *hipOs*. Los ensayos enzimáticos de los extractos de la cepa mutante en las condiciones mencionadas, no mostraron actividad enzimática, cuando se utilizó NAO y L-glutamato como sustratos, lo que difiere de la cepa silvestre con actividad específica de 14.0 ± 1.7 U. Dicha actividad fue similar cuando la bacteria crece en MSA suplementado con L-ornitina o L-arginina, lo que sugiere que la síntesis de la ArgJ no es reprimida de forma indirecta por estos aminoácidos. A nivel de secuencia de aminoácidos la enzima tiene mayor identidad con la ArgJ de *N. gonorrhoeae* (43 %) y menor con la de *C. glutamicum* y *B. subtilis* (37 %) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre las ArgJs caracterizadas previamente, en conjunto con la ArgJ de *S. meliloti*.

Especie	% de identidad de aminoácidos										
	Sco	Mt	Scl	Tt	Tm	Tn	Gs	Bs	Sm	Ng	Pa
Cg	50	58	36	38	37	36	37	35	37	36	37
Sco		59	34	41	41	40	41	37	38	36	36
Mt			33	39	39	39	38	37	38	36	38
Scl				42	35	35	39	36	42	36	34
Tt					45	45	46	44	42	41	39
Tm						87	48	47	40	38	39
Tn							47	46	39	38	38
Gs								65	39	40	38
Bs									37	37	34
Sm										43	41
Ng											54

Cg: *C. glutamicum*; Sco: *S. coelicolor*; Mt: *M. tuberculosis*; Scl: *S. clavuligerus*; Tt: *T. thermophilus*; Tm: *T. marítima*; Tn: *T. neapolitana*; Gs: *G. stearothermophilus*; Bs: *B. subtilis*; Sm: *S. meliloti*; Ng: *N. gonorrhoeae*; Pa: *P. aeruginosa*.

5.1 LA Arg(A) NO FUE IDENTIFICADA.

Los resultados de la ArgJ de *S. meliloti* demostraron que la enzima es monofuncional, por lo que la existencia de una ArgA en la bacteria es de vital importancia. La primer técnica utilizada en la búsqueda del gen *argA* fue la mutagénesis al azar, con la cual se obtuvieron 60,000 clonas utilizando el transposón mini *Tn5/lacZ1*, de las cuales ocho fueron auxótrofas para L-arginina, pero ninguna para NAG. Se observó que una cepa crece en medio MSA suplementado con NAO, por lo que se pensó que la mutación debía estar ubicada en el gen *argB*, *argC* o *argD*. Otras cuatro cepas crecieron después de adicionar L-citrulina, pero no

cuando se adicionó L-ornitina, por lo que la mutación debió estar en el gen *argF*. Las tres cepas restantes crecieron cuando el MSA contenía L-arginina, pero no cuando contiene L-citrulina, por lo que la mutación debió estar ubicada en el gen *argG* o *argH*.

Debido a que los resultados obtenidos no fueron los esperados con la mutagénesis al azar, se procedió a realizar un ensayo de complementación heteróloga con un banco de cósmidos de *S. meliloti* en una cepa de *E. coli* MC4100 $\Delta argA::Km$. Los cósmidos contienen fragmentos de DNA de 22 a 40 kb, lo que arrojó una media de 31 kb (Sohlenkamp et al., 2000). Con base en lo anterior, se colocaron 6,000 colonias de la cepa mutante con su respectivo cósmido en MM9 para representar el genoma de *S. meliloti* aproximadamente 27 veces. Después de siete días de incubación no se observó el crecimiento de alguna colonia, por lo que ningún fragmento de DNA contenido en la genoteca restauró la mutación.

Como a nivel genético no se logró identificar el *arg(A)* de *S. meliloti*, se decidió trabajar con las proteínas de la cepa silvestre, utilizando el extracto total y sus respectivas fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. La actividad enzimática del extracto total fue de $3,008 \pm 122$ nmol de NAG min^{-1} mg de proteína $^{-1}$; la cual únicamente fue lineal durante los primeros 10 min. Por otro lado, de las 35 fracciones obtenidas por cromatografía ninguna mostró actividad.

5.2 LA ArgB ES INHIBIDA POR L-ARGININA.

La ArgB de *S. meliloti* (SMc01726) está compuesta por 295 residuos, lo que resultó en un peso molecular teórico de 33 kDa y un pI de 5.6, con base en los cálculos realizados en el servidor de ExPASy (Gasteiger et al., 2003).

Basados en la estructura cristalografía de la ArgB de *P. aeruginosa* (Ramón-Maiques et al., 2006) y el alineamiento de la secuencia de aminoácidos (Figura 6), se predijó que la extensión de 23 aminoácidos en el N-terminal de ArgB de *S. meliloti* pliega en la N α -hélice, presente en las ArgBs inhibidas por L-arginina (Ramón-Maiques et al., 2002; 2006). En esta región se encontraron los residuos de interfaz hidrofóbica, los cuales pueden ser idénticos (Leu15, Ala18, Leu19, Pro200) o con sustituciones conservativas (Ala12, Leu14, Ala16 y Gln17), a

través de las ArgBs caracterizadas previamente (Figura 6). Además, se encontraron los dos sitios de unión a L-arginina (Tyr21 y Tyr25), los cuales no son idénticos, pero sí conservados en las ArgBs.

Utilizando el alineamiento (Figura 6) y las estructuras cristalográficas reportadas para la ArgB de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Ramón-Maiques et al., 2002; 2006), se dedujo que el dominio AAK de la ArgB de *S. meliloti* comienza con el lóbulo N-terminal en el Glu26 y termina en la Ala206. En esta región se encuentran los residuos de unión al NAG (Gly67-Gly69, Arg90, Leu104, Pro180, Asn196-Asp200), tres a ATP (Lys33, Gly35, Gly36) y cuatro de interfaz hidrofóbica involucrados en la formación de los complejos hexaméricos (Ala54, Leu55, Gln57 y S58). Tanto los residuos de unión a NAG como ATP fueron idénticos en las ArgBs caracterizadas hasta ahora, mientras que los de interfaz hidrofóbica son variables. La región C-terminal tiene cinco sitios de unión a L-arginina (Arg213, Glu284, Ile285, Thr287 y Gly292), que en algunos casos no son idénticos, pero sus sustituciones podrían cumplir con la misma función, lo cual también sucede con los dos de los seis residuos de unión a ATP (Thr218, Val220, Gly222, Gly252, Met253 y Lys256). Además, en esta región también se encuentran los residuos que participan en interacciones hidrofóbicas utilizados en los hexámeros (Leu282, Leu283, Phe286 y Gly290).

Figura 6. Alineamiento de las secuencias de las ArgBs caracterizadas previamente, en conjunto con la ArgJ de *S. meliloti*. En la parte superior con flechas de color naranja se representa las estructuras secundarias β -laminar determinadas por cristalografía, en blanco por medio de simulaciones y con rectángulos en magenta las α -hélices. Los residuos con fondo de color rojo indican los sitios de unión a L-arginina, en amarillo al NAG y en turquesa al ATP (Ramón-Maiques et al., 2002; 2006). En la parte inferior con puntos de color naranja se indican los residuos de han sido mutados experimentalmente en las ArgBs inhibidas por L-arginina y en verde los de interfaz hidrofóbica, involucrados en la formación de los hexámeros (Ramón-Maiques et al., 2006; Fernández-Murga y Rubio, 2008; Xu et al., 2012). Tt: *T. thermophilus*; Ec: *E. coli*; Gs: *G. stearothermophilus*; Cc: *C. crenatum*; Cg: *C. glutamicum*; Scl: *S. clavuligerus*; Pa: *P. aeruginosa*; Tm: *T. marítima* y Sm: *S. meliloti*.

Los ensayos realizados con la ArgB de *S. meliloti* purificada, mostraron que el NAG y ATP tienen una K_m de 2.10 ± 0.03 y 1.97 ± 0.50 mM respectivamente; con una V_{max} de 23.20 ± 3.20 μmol de NAG-5-fosfato $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína. Cuando se adicionó 1 mM de la L-arginina al

ensayo enzimático, la K_m tanto para NAG y ATP aumentó (7.03 ± 0.08 y 2.47 ± 0.05 mM, respectivamente), mientras que la V_{max} disminuyó (15.09 ± 2.80 μmol de NAG-5-fosfato $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína). Utilizando diferentes concentraciones de L-arginina en el ensayo enzimático se determinó que 0.90 ± 0.04 mM de L-arginina inhiben 50 % de la actividad, lo que no sucedió con la L-ornitina.

El análisis de una cepa mutante en el gen *argB* de *S. meliloti* en MSA no mostró crecimiento (Figura 2a del artículo), pero dicha condición pudo ser restaurada por complementación química con 1 mM de L-ornitina (Figura 2b del artículo) o L-arginina. La introducción de la construcción pBB5-argB, también restauró la auxotrofia y los extractos tuvieron actividad de 287 ± 21 U, lo que es 7 veces superior a la cepa silvestre (41 ± 5 U). Los ensayos de actividad enzimática de los extractos de la cepa silvestre cuando se adicionó 1 mM de L-arginina al MSA, mostraron actividad similar a los de la cepa en el medio sin suplementar (47 ± 9 U), lo que sugirió que el aminoácido no reprime la síntesis de la enzima. A nivel de secuencia de aminoácidos la ArgB de *S. meliloti* mostró la menor identidad con la *E. coli*, siendo más parecida a la *T. marítima* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre las ArgBs caracterizadas previamente, en conjunto con la ArgB de *S. meliloti*.

Especie	% de identidad de aminoácidos							
	Ec	Gs	Cc	Cg	Scl	Pa	Tm	Sm
Tt	34	41	37	37	39	37	33	39
Ec		37	28	28	31	30	32	30
Gs			38	38	35	39	43	40
Cc				100	55	42	43	44
Cg					55	42	43	44
Scl						45	43	42
Pa							51	48
Tm								52

Tt: *T. thermophilus*; Ec: *E. coli*; Gs: *G. stearothermophilus*; Cc: *C. crenatum*; Cg: *C. glutamicum*; Scl: *S. clavuligerus*; Pa: *P. aeruginosa*; Tm: *T. marítima* y Sm: *S. meliloti*.

5.3 LA ArgE ES FUNCIONAL

La ArgE de *S. meliloti* consta de 374 aminoácidos, lo que resultó en un peso molecular teórico de 39.7 kDa 33 y un pI de 5.47, con base en los cálculos realizados en el servidor de ExPASy (Gasteiger et al., 2003). A diferencia de la ArgJ y ArgB, que se encuentran en el cromosoma, la ArgE está ubicada en el megaplásmido pSymA (*sma1836*).

Basados en la estructura cristalográfica *X. campestris* (Shi et al., 2007) y el alineamiento de las secuencias de las ArgEs caracterizadas (Figura 7), se determinó que el dominio catalítico abarca los residuos del 1 al 166 y del 276 al 366, en donde se encuentran los cinco sitios de unión al metal (His72, Asp103, Glu131, Glu153 y His340), que son invariables y siete de unión al sustrato, los cuales pueden ser idénticos o con sustituciones conservativas (E130, E131, A132, W177, Y314, I336 y H340) (Figura 7). Por otra parte, el dominio de interfaz incluye los residuos del 167 al 275 y su función es entrelazar dos monómeros para la formación de los dímeros, los cuales son biológicamente activos (McGregor et al., 2013; Shi et al., 2007). A nivel de secuencia de aminoácidos la ArgE de *S. meliloti* mostró menor identidad con la de *X. campestris* y mayor con la de *Moritella* sp (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre las ArgEs caracterizadas previamente, en conjunto con la ArgE de *S. meliloti*.

Especie	% de identidad de aminoácidos			
	Mx	Sm	Ec	Msp
Xc	26	29	25	26
Mx		32	32	30
Sm			31	33
Ec				60

Xc: *X. campestris*; M. *xanthus*; S. *meliloti*; Ec: *E. coli* y Msp: *Moritella* sp.

La enzima purificada mostró una K_m para NAO de 4 mM con una V_{max} de 1200 ± 95 U. Cuando el metal fue removido de la enzima su actividad se redujo un 90 %, la cual fue totalmente restaurada por la adición de 0.2 mM de $CoCl_2$ y parcialmente por 0.2 mM de $MnCl_2$, mientras que el $ZnSO_4$ no mostró algún efecto (Hernández et al., 2015). Los ensayos de complementación heteróloga utilizando la construcción pET-SUMO-argE y pGEMM3Z-argE en una cepa mutante *argE* de *E. coli* BL21 (DE3), no restauraron el crecimiento de la bacteria en MM9, lo cual se consiguió por complementación química con la adición de 1 mM de L-ornitina.

La mutación del gen *argE* en *S. meliloti* no mostró un efecto sobre el crecimiento en el MSA, por la existencia de un *argJ*; cuya actividad enzimática de los extractos fue de 22.2 ± 1.5 U y fue superior a los de la cepa silvestre (14.0 ± 1.7 U), lo que sugirió que existe un aumento en la síntesis de la ArgJ ante la inactivación de *argE* (Cuadro 2 del artículo).

Figura 7. Alineamiento de las secuencias de las ArgEs caracterizadas previamente, en conjunto con la ArgE de *S. meliloti*. En la parte superior con flechas de color naranja se representa las estructuras secundarias β -laminar y con rectángulos en magenta las α -hélices (Shi et al., 2007). Los residuos con fondo de color turquesa indican los sitios de unión a metal, los de color rojo a NAO y con un punto naranja en la parte inferior del alineamiento el residuo que ha sido mutado experimentalmente (McGregor et al., 2013; Shi et al., 2007). Xc: *X. campestris*; Mx: *M. xanthus*; Sm: *S. meliloti* y Msp: *Moritella* sp.

5.5 LAS HipOs SON RESPONSABLES DE SINTETIZAR L-ORNITINA EN LA CEPA MUTANDE *argEJ* DE *S. meliloti*.

Los resultados de las mutaciones tanto del gen *argE* como *argJ* individualmente no mostraron un efecto negativo sobre el crecimiento en MSA, por lo que se procedió a construir una cepa con ambos genes inactivados para observar su crecimiento en el MSA y realizar ensayos de actividad enzimática para la desacetilación de NAO en los extractos. Los datos de las curvas de crecimiento mostraron que la cepa de *S. meliloti* mutante *argEJ* fueron similares a los de las mutantes individuales y silvestre (Figura 2b del artículo). Por otra parte, la actividad enzimática de aminoacilasa fue de 0.64 ± 0.17 U, lo cual fue similar en la mutante en *argE* (0.68 ± 0.09 U), pero menor a la cepa silvestre (1.24 ± 0.15 U) (Cuadro 2 del artículo). Los ensayos enzimáticos con los extractos de la cepa mutante en *argEJ* crecidas en MSA suplementada con L-ornitina o L-arginina mostraron una disminución y un aumento de la actividad, respectivamente (0.54 ± 0.01 U y 0.92 ± 0.06 U) comparado con el medio sin suplementar (0.64 ± 0.17 U) (Cuadro 2 del artículo). Lo anterior sugiere la existencia de cuando menos un gen que codifique para una enzima con la capacidad de desacetilar NAO, restaurando el crecimiento y además, cuya síntesis es parcialmente afectada por L-ornitina, pero no por L-arginina.

Un trabajo previo de Hani et al. (1999), mostró que los genes *hipO* en *C. jejuni* podían restaurar el crecimiento de una cepa mutante de *E. coli* tanto *argA* como *argE* en MM9 y debido a la existencia de tres genes en el genoma de *S. meliloti* cuya identidad es igual o superior al 35 % con los genes de *C. jejuni*, se decidió trabajar con estos genes y sus respectivas proteínas (Cuadro 7). Con excepción del gen *smb21279* (*hipO3*), tanto *smc00682* (*hipO1*) como *smc02256* (*hipO2*) se encuentran en el cromosoma (Cuadro 8).

Analizando la secuencia de aminoácidos de las enzimas codificadas por los genes *hipO*, en el servidor de ExPASy (Gasteiger et al., 2003) se determinó que el peso molecular teórico está en el rango de 41 a 43 kDa y el pI entre 5 y 6.

Cuadro 7. Porcentaje de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos entre las HipOs de *C. jejuni* y *S. meliloti*.

Proteína	% de identidad de aminoácidos			
	CjHipO1	HipO3	HipO2	HipO1
CjHipO2	38	35	35	37
CjHipO1		43	43	41
HipO3			47	46
HipO2				49

CjHipO2: HipO2 de *C. jejuni*; CjHipO1: HipO1 de *C. jejuni*; HipO3: Homólogo de los HipOs de *S. meliloti*; HipO2: HipO2 de *S. meliloti* y HipO1: HipO1 de *S. meliloti*.

Cuadro 8. Características generales de las HipOs.

Gen	Proteína	No. de aminoácidos	Peso teórico (kDa)	pI
<i>smc00682</i>	HipO1	387	41.1	5.9
<i>smc02256</i>	HipO2	393	42.6	5.3
<i>smb21279</i>	HipO3	389	41.3	5.1

A nivel estructural las proteínas HipO no cuentan con una estructura cristalográfica reportada, pero HipO1 tiene un 38 % de identidad con la hidrolasa YxeP *B. subtilis* (Minasov et al., 2005). Con base en la estructura de YxeP y el alineamiento se determinó que las proteínas HipO de *S. meliloti* tienen los cinco residuos conservados de unión al metal (C98, H100, E134, H158 y H350), pero hasta ahora se desconoce los sitios de unión al sustrato e interfaz para la formación de oligómeros (Figura 8).

El ensayo de actividad de desacetilación para NAO de las proteínas HipO purificadas de *S. meliloti* mostró que las tres enzimas son funcionales en condiciones *in vitro*, siendo HipO1 la más activa, seguida por HipO3 y SmHipO2 (549 ± 19 , 219 ± 19 y 460 ± 5 U, respectivamente). Lo anterior fue corroborado por ensayos de complementación heteróloga, utilizando la cepa mutante *argE* de *E. coli* BL21 (DE3) en MM9, donde los genes *hipO1* y *hipO2* restauraron el crecimiento, cuando sus ORFs fueron clonados en el pET 17b bajo la expresión del promotor T7 con o sin la adición de 1 mM de IPTG, lo que no sucedió con el gen *hipO3*. A diferencia de la cepa con el *hipO1* cuya velocidad de crecimiento fue similar a la cepa silvestre ($\mu = 0.45$ y 0.48 h^{-1} , respectivamente), la cepa con el *hipO2* creció 4 veces más lento ($\mu = 0.11 \text{ h}^{-1}$), pero con una DO_{620} similar después de 24 h (Figura 3 del artículo).

Figura 8. Alineamiento de las secuencias de las HipOs caracterizadas previamente, en conjunto con las HipOs de *S. meliloti* y la hidrolasa YexP de *B. subtilis*. En la parte superior con flechas de color naranja se representa las estructuras secundarias β -laminar y con rectángulos en magenta las α -hélices. Los residuos con fondo de color turquesa indican los sitios de unión a metal (Minasov et al., 2005). CjHipO2: HipO2 de *C. jejuni*; CgHipO1: HipO1 de *C. jejuni*; HipO3, HipO2 y HipO1: HipOs de *S. meliloti*.

5.6 LOS GENES *argB*, *argE* Y *argJ* NO SON REGULADOS TRANSCRIPCIONALMENTE.

A pesar de que a nivel genético no existe anotado un regulador para los genes involucrados en el metabolismo de la L-arginina en *S. meliloti*, se construyeron fusiones transcripcionales para los genes *argB*, *argB* y *argJ*, con el propósito de conocer si existía algún mecanismo de regulación. La región intergénica más una porción del ORF de cada uno de los genes fue fusionada al gen reportero *gusA* e introducidas en la cepa silvestre para su análisis en condiciones de MSA y suplementado con L-ornitina o L-arginina. Los resultados mostraron que no existe un cambio a nivel de la transcripción para ninguno de los genes analizados bajo las condiciones evaluadas (Cuadro 4 del artículo). En promedio para las tres condiciones evaluadas el gen *argJ* fue aproximadamente 2 y 3.5 veces más expresado respecto a *argB* y *argE*.

6. DISCUSIÓN

6.1 LOS GENES *arg* CARECEN DE SINTENIA.

En *S. meliloti* con excepción del operón *argDF*, los genes restantes involucrados en la biosíntesis de L-arginina están dispersos en el genoma, como sucede en los géneros *Pseudomonas* y *Neisseria*, que pertenecen a las γ y β -proteobacterias, respectivamente (Haas et al., 1977; Sakanyan et al., 1992; Martin y Mulks, 1992). En la familia *Vibrionaceae* y *Enterobacteriaceae* pertenecientes a las γ -proteobacterias, los genes se encuentran agrupados en diferentes patrones (*argECBFGH*, *argECBGH* y *argECBH*) (Xu et al., 2000). Fuera del Phylum *Proteobacteria* ocurre algo similar, con bacterias cuyos genes muestran distintos agrupamientos como *argCJ* en *Thermus* (Baetens et al., 1998), *argCJBD* o *argCJBDF* en varias Gram(+) (Bringel et al., 1997) y *argGHCJBD* en *T. maritima* (Nelson et al., 1999) o sin agrupar como en *Aquifex* (Deckert et al., 1998) y *Synechocystis* (Kaneko et al., 1996). Lo anterior indica que no existe sintenia en los genes *arg* y que básicamente ha existido un arreglo exhaustivo a nivel de Phylum y/o dentro de los mismos (Xu et al., 2000; Guerrero et al., 2005).

6.2 LA ArgJ DE *S. meliloti*.

La primera hipótesis en probar fue si la ArgJ de *S. meliloti* era bifuncional, como se establecía en la anotación de su genoma. Los resultados de los ensayos enzimáticos y de complementación heteróloga demostraron que la proteína es monofuncional. Las proteínas ArgJ pertenecen a la superfamilia Ntn con base en su plegamiento (Elkins et al., 2005) y surgen como péptidos precursores, que maduran después de la autoproteólisis entre los residuos Ala199 y Thr200 del motivo ATML (Sakanyan et al., 1993). Cabe mencionar que el motivo no es idéntico a través de las ArgJ caracterizadas hasta ahora, ya que en la ArgJ de *S. clavuligerus* hay una Leu en lugar de una Met en la posición 201 (Figura 5), pero ambos residuos son hidrofóbicos, por lo que se sugiere que cumplen funciones similares. Basados en las estructuras de las ArgJ de *S. clavuligerus* (Elkins et al., 2005) y *M. tuberculosis* (Sankaranarayanan et al., 2010) se sabe que la proteína está formada por dos dominios, que al interactuar conforman el sitio activo, el cual funciona a través de un mecanismo de ping-pong, donde la enzima es acetilada por el primer sustrato, el cual es disociado permitiendo al segundo sustrato unirse y tomar el grupo acetilo de la enzima (Marc et al., 2000). Dada la

naturaleza de los intermediarios enzimáticos acetilados, los sitios de unión para ambos sustratos son parcialmente compartidos. El grupo acetilo de la NAO se une a los residuos T122 y G123 inicialmente, que son idénticos en todas las ArgJs y después del ataque nucleofílico de T200, el grupo acetilo queda unido formando el complejo acil-enzima, liberando la L-ornitina. La región que correspondería a la L-ornitina de la NAO involucra a los residuos T166, K189, M193, T200, E280, N399 y T/S404 (Figura 5). Los siete residuos son también utilizados por el L-glutamato, al cual es transferido el grupo acetilo para formar NAG (Sankaranarayanan et al., 2010). La última posición, es el único residuo que no es idéntico en los sitios de unión al sustrato, pero tanto T404 como S404 conservan la característica de ser pequeños y contienen un grupo hidroxilo en su cadena lateral, cuya función es estabilizar el N° de la NAO o uno de los O del grupo carboxilo del L-glutamato.

La ArgJ de *S. meliloti* mostró una K_m para NAO similar a la de *G. stearothermophilus* (Marc et al., 2000) y *S. clavuligerus* (de la Fuente et al., 2004), pero más de tres veces menor a la *T. neapolitana* y *Methanococcus jannashii* (Marc et al., 2000); mientras que para L-glutamato el mismo parámetro es menor comparado con las cuatro enzimas. La V_{max} alcanzada por la ArgJ de *S. meliloti* es más de 10 veces menor con respecto a la *G. stearothermophilus* y *T. Neapolitana* (Marc et al., 2000), pero aproximadamente 93 veces mayor a la *S. clavuligerus* (de la Fuente et al., 2004) (Cuadro 3 del artículo). Por otra parte, la actividad enzimática de la ArgJ de *S. meliloti* fue inhibida de forma competitiva por L-ornitina, lo cual ya había sido reportado en *M. tuberculosis* debido a que ocupa parcialmente los sitios de unión a la NAO, impidiendo que este pueda ocupar dicha posición y transferir el grupo acetilo a la enzima (Sankaranarayanan et al., 2010).

6.3 LA Arg(A) DE *S. meliloti*.

Como resultado de una ArgJ monofuncional en *S. meliloti*, la existencia de una Arg(A) es necesaria para síntesis del NAG, como sucede en *C. jejuni*, *C. glutamicum*, *M. tuberculosis*, *M. profunda* y *M. abyssi* (Errey y Blanchard, 2005; Xu et al., 2000; 2006; Hani et al, 1999; Petri et al., 2013), donde dichas enzimas realizan una función anaplerótica. Por trabajos previos se sabe que el porcentaje de identidad entre los miembros de la familia GNAT es

igual o menor al 10 % (Shi et al, 2015), lo que limita el uso de secuencias de proteínas identificadas experimentalmente con actividad sintasa involucradas en la síntesis del NAG y por consecuencia la utilización de la Arg(A) de *M. tuberculosis* (Errey y Blanchard, 2005) para identificar la Arg(A) en *S. meliloti*, la cual es la bacteria más cercana taxonómicamente en la que se ha caracterizado una de estas enzimas. Con base en lo mencionado se utilizaron tres diferentes enfoques y a pesar de ello, no se logró identificar el gen que codifica para la enzima que cataliza la síntesis del NAG probablemente a: i) el gen no cuenta con la secuencia A-GNTYWRANC-T (Goryshin et al., 1998) ni es rico en GC (Herron et al., 2004; Green et al. 2012), características importantes para aumentar la probabilidad de inserción del miniTn5; ii) la síntesis de NAG puede ser realizada por varios genes, lo que enmascara la posible mutación del gen cuando se utiliza el miniTn5, resultando en un fenotipo similar a la cepa silvestre. La redundancia genética para la síntesis del primer intermediario en la vía de L-arginina ha sido reportado en *C. jejuni* y *C. glutamicum*. En la primera bacteria tanto el gen *hipO* como *argO* pueden complementar una cepa mutante *argA* de *E. coli* (Hani et al, 1999), mientras que en la segunda la mutación del gen *cg3035* (C-Arg(A)) no ocasiona auxotrofia para L-arginina y únicamente se reduce a un 30 % los niveles intracelulares de NAG (Petri et al., 2013); iii) el banco de cósmidos utilizado no está completamente representado, lo que resulta en la ausencia del gen de interés y como consecuencia imposibilita la complementación (West et al., 2002); iv) el promotor del gen no fue reconocido por el factor sigma del huésped, lo que a su vez evitó su transcripción por la RNA polimerasa y su posterior traducción en el ribosoma, evitando la síntesis del NAG y el restablecimiento del fenotipo de silvestre; v) la redundancia genética para la síntesis del NAG abre la posibilidad de que la actividad específica de dichas proteínas sea baja como sucede con la Arg(A) de *M. tuberculosis* (Errey y Blanchard, 2005), por lo que la suma de sus actividades debe ser necesaria para el crecimiento y desarrollo de la bacteria. Aunado a lo anterior, la función de la probable Arg(A) en *S. meliloti* sería sintetizar el primer NAG a partir de L-glutamato y acetil-CoA, el cual posteriormente sería sintetizado de forma conjunta por la Arg(A) y ArgJ, esta última reciclando el grupo acetilo de la NAO y transfiriéndolo al L-glutamato; mientras que en la cepa mutante ArgA de *E. coli* dicho grupo se perdería en forma de acetato, haciendo

necesaria la síntesis de *ново* del NAG por la Arg(A) y vi) la Arg(A) de *S. meliloti* es poco estable y/o necesita formar un complejo con ArgB, lo cual ya había sido reportado en *Saccharomyces cerevisiae* (Abadjieva et al., 2001), donde el complejo ArgA-ArgB promueve la actividad sintasa y su disociación la inhibe. En *S. meliloti* el complejo ArgA-ArgB, podría perderse durante el fraccionamiento por cromatografía de exclusión molecular, por lo cual la actividad enzimática es indetectable en las fracciones pero sí en el extracto total.

Derivado de los ensayos enzimáticos del extracto total, se puede sugerir que cuando menos la síntesis del NAG ocurre a través de una enzima que utiliza tanto L-glutamato como acetil-CoA como sustratos, ya que el producto fue detectado durante los ensayos de radiactividad.

6.4 LA ArgB DE *S. meliloti*.

Otra de las hipótesis planteadas en el trabajo fue determinar si la ArgB de *S. meliloti* era inhibida por L-arginina, para lo cual fue determinada primero su actividad quinasa. Los resultados del ensayo enzimático determinaron que la enzima cuenta con actividad quinasa con una K_m para NAG y ATP similar a la ArgB de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. clavuligerus* (Haas y Leisinger, 1975; Fernández-Murga et al., 2008; Gil-Ortiz, 2010; Xu et al., 2012). Lo anterior es congruente con la presencia de residuos conservados de unión para ambos sustratos en el lobuno N y C-terminal. A nivel estructural la unión del NAG y ATP favorecen la conformación cerrada del sitio activo, el cual puede oscilar entre cerrado y abierto como resultado de la movilidad interna de cada subunidad; haciendo a la enzima catalíticamente activa (Ramón-Maiques, et al., 2002; 2006; Fernández-Murga y Rubio, 2008).

Posteriormente, se determinó que la ArgB de *S. meliloti* es inhibida por L-arginina, lo que a su vez es consistente con la ruta del reciclaje y al parecer es el punto de regulación del flujo metabólico. Con base en el análisis de las estructuras de las ArgBs de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *T. maritima* se sabe que las ArgBs inhibidas por L-arginina cumplen con tres características: i) formación de complejos hexaméricos, ii) presencia de sitios de unión al aminoácido y iii) cambio conformacional. Las tres características podrían ser cumplidas por la ArgB de *S. meliloti* con base en el alineamiento de su secuencia respecto a las ArgBs caracterizadas (Figura 6) y las estructuras cristalográficas reportadas para *P. aeruginosa* y *T. marítima*. En

primer lugar cuenta con la extensión N-terminal la cual podría plegar en una N-hélice, la cual está involucrada en la formación de complejos hexaméricos (Ramón-Maiques, et al., 2002; 2006). Segundo, también cuenta con siete de los ocho sitios de unión a L-arginina, lo cuales no son idénticos a través de las ArgBs inhibidas por el aminoácido, pero las sustituciones podrían realizar la misma función, con base en sus características fisicoquímicas. Tercero, el cambio conformacional de las estructuras cuaternarias, la cual también podría suceder debido a que es una característica que surge como resultado de cumplir las dos anteriores. Por el análisis de la estructura de la ArgB de *P. aeruginosa* y *T. marítima*, se sabe que cuando la L-arginina se une a la enzima provoca un extensivo arreglo de interacciones entre los residuos del complejo hexamérico que forman un anillo. El anillo tiene un diámetro externo de 100 Å, el cual aumenta en 8 Å en presencia del inhibidor y debido a que los centros activos se encuentran en la periferia del anillo, su expansión incrementa en 3 Å la distancia entre el sitio de unión al ATP y el NAG, haciendo a la enzima catalíticamente incompetente (Ramón-Maiques, et al., 2006).

6.5 LA ArgE DE *S. meliloti*.

La siguiente hipótesis a probar fue si el gen anotado como *argE* ubicado en el pSymA codificaba para una N-acetilornitina desacetilasa. Los ensayos de actividad enzimática mostraron que la enzima es funcional, con una K_m para NAO más de tres veces superior a la ArgE de *E. coli* (Javid-Majd y Blanchard; 2000). Basados en la estructura cristalográfica de la ArgE de *X. campestris* y el alineamiento de las secuencias, se determinó que la ArgE de *S. meliloti* tiene en el dominio catalítico los residuos de unión al metal y NAO. Los cinco sitios de unión al metal, son idénticos a través de las ArgEs caracterizadas hasta ahora, mientras que para el sustrato hay cuatro idénticos (E130, E131, I336 y H340), dos aromáticos (W/F177, Y/F314) y un hidrofóbico (I32A/T/V) (Shi et al., 2007). El residuo T315 no fue conservado entre las ArgEs, lo que sugiere que probablemente no es importante en la unión a la NAO. La *argE* de *S. meliloti* puede utilizar Co^{2+} como catión divalente de forma similar a la *E. coli*, pero difiere en su capacidad para utilizar Zn^{2+} (Javid-Majd y Blanchard; 2000; McGregor et al., 2013). La habilidad que tiene una enzima para utilizar un catión preferentemente sobre otros es desconocido, pero se sabe que su función de forma general es modificar el flujo

electrónico de la proteína o el sustrato y sin el ion metálico apropiado la reacción bioquímica catalizada por la enzima procedería lentamente (Glusker et al., 1999). Por otra parte, el dominio de interfaz tiene la función de interactuar con el mismo dominio de otra subunidad para formar dímeros (Shi et al., 2007), que a su vez pueden formar tetrámeros u octámeros, lo que hace a la enzima catalíticamente activa como sucede con la *E. coli* (McGregor et al., 2005).

6.6 LA PROTEÍNAS HipO DE *S. meliloti*.

La siguiente hipótesis en probar fue si las proteínas codificadas por los genes *hipO* de *S. meliloti* eran capaces de sinterizar L-ornitina. Para demostrar esta cuestión tanto *argE* como *argJ* fueron inactivados de forma individual y conjunta en *S. meliloti*, ya que ambos genes participan en la síntesis del aminoácido. Las cepas mutantes en cada uno de los genes y la doble, no mostraron auxotrofia para L-ornitina, mostrando un crecimiento similar a la cepa silvestre en MSA (Figura 2a del artículo). Con base en los resultados de la actividad enzimática de aminoacilasa tanto de los extractos como de las enzimas purificadas (Cuadro 2 del artículo), se dedujo que las proteínas codificadas por los genes *hipO* son las responsables de compensar la ausencia de ArgE y ArgJ en *S. meliloti*, restableciendo el crecimiento. Estos resultados fueron corroborados por los ensayos de complementación heteróloga en la cepa mutante *argE* de *E. coli*, donde tanto *hipO1* como *hipO2* restauraron la auxotrofia para L-ornitina en MM9. En *C. jejuni* los genes *hipO* pueden restablecer el crecimiento tanto de una cepa mutante *argE* como *argA* de *E. coli*, esto último no sucede con los genes de *S. meliloti*. A nivel de secuencia de aminoácidos las proteínas de ambos organismos comparten al menos 35 % de identidad (Cuadro 7) y tienen conservados los sitios de unión al metal (Figura 8). A pesar de que las proteínas HipO han sido caracterizadas *in vitro* en otros organismos como *Pseudomonas putida* (Miyagawa et al., 1985) y *Bacillus* (Ottow, 1974), su función *in vivo* no ha sido determinada.

6.6 HOMOLOGÍA ENTRE HipO y ArgE EN *S. meliloti*.

Como la ArgE y las HipOs de *S. meliloti* pueden realizar la misma función enzimática tanto *in vitro* como *in vivo* y pertenecen a la misma familia de proteínas (peptidasas M20), podrían

ser proteínas homólogas a pesar de que a nivel de secuencia de aminoácidos únicamente comparten entre un 19 y 22 % de identidad. Para elucidar esta cuestión se realizó un modelo de la HipO1 utilizando como templado la proteína YexP de *B. subtilis* (Minasov et al., 2005), con la cual tiene una identidad del 39 % y una cobertura del 90 %. El modelo de HipO1 tuvo un RMSD de 1.8 Å, lo que significa que es confiable, ya que el punto de corte es de 2 Å (Bordogna et al., 2011) (Figura 9b). El modelo de HipO1 fue comparado con la estructura cristalográfica de ArgE de *X. campestris* (Figura 9a) por medio de un alineamiento estructural y superposición, resultando en valor de 0.71, lo que significa que ambas proteínas tienen la misma estructura con base en el punto de corte de TM align (Zhang y Skolnick, 2005) (Figura 9c).

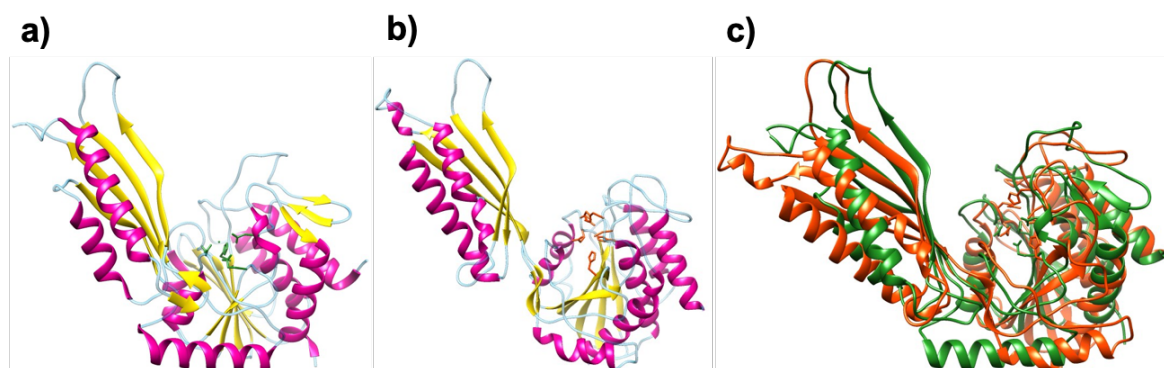


Figura 9. Comparación de la estructura cristalográfica de la ArgE de *X. campestris* (a) (Shi et al., 2007) y el modelo de HipO1 de *S. meliloti* (b), por medio de una superposición (c). En color verde se representa la estructura de ArgE y en naranja el modelo de HipO1.

Pearson y Sirerck (2005), mencionan que dos proteínas con estructura y función similar son consideradas homólogas. Basados en este supuesto, se sugiere que las proteínas HipO y ArgE son homólogas, ya que tienen estructura similar y realizan la misma actividad enzimática.

6.7 REDUNDANCIA GENÉTICA EN LA SÍNTESIS DE L-ORNITINA EN BACTERIAS.

Al fenómeno donde uno o más genes compensan parcial o totalmente la pérdida de uno se le denomina redundancia genética y puede ser a nivel individual de genes o redes metabólicas. La redundancia en redes metabólicas se caracteriza por que dos genes sin tener un ancestro común o aparente similitud en función molecular, todavía son redundantes

funcionalmente a nivel del sistema (Zhang, 2012) y es el caso de la síntesis de L-ornitina en *S. meliloti*, donde ArgJ, ArgE y HipOs, pueden realizar la misma función. Finalmente, a pesar de que las tres proteínas pueden realizar la misma función, se sugiere que la ArgJ contribuye con la mayor parte de la actividad de desacetilación de NAO en *S. meliloti* en la síntesis de L-ornitina, basados en su actividad específica de la enzima recombinante purificada, de los extractos tanto de la cepa silvestre como de las mutante *argE* y su alto nivel de expresión.

Por otra parte, la redundancia genética puede encontrarse en diferentes puntos de la síntesis de L-arginina en bacterias. En *E. coli* W3110 la síntesis de NAO puede ser realizada por ArgD, AstC, GabT y PuuE; y se requiere de la inactivación conjunta para su auxotrofia (Lal et al., 2014). En *P. aeruginosa* existe un *argE*, *argJ* y *hipO* y la prototrofia detectada tanto en la mutante *argE* como *argJ*, puede ser resultado de la presencia de alguno de los dos restantes (Jacobs et al., 2003). En *S. meliloti* existe tanto *argH1* ubicado en el cromosoma como *argH2* en el pSymB, los cuales necesitan ser inactivados para la auxotrofia en la síntesis de L-arginina (diCenzo y Finan, 2015). La redundancia genética es común y evolutivamente conservada debido a: i) brinda robustez contra perturbaciones genéticas como las mutaciones deletéreas; ii) las enzimas muestran eficiencia metabólica diferencial bajo distintas condiciones ambientales (Zhang, 2012), iii) la suma del producto de sus actividades permite un incremento en la producción del metabolito; vi) sus productos únicamente se traslapan parcialmente en sus sustratos específicos y iii) los genes o proteínas son diferencialmente regulados (diCenzo y Finan, 2015).

La siguiente cuestión que surgió fue determinar la frecuencia de ArgJ, ArgE o HipO o sus respectivas combinaciones en bacterias. Para estimar esto, se utilizó la secuencia de aminoácidos de las tres proteínas de *S. meliloti* con la finalidad de encontrar ortólogos en la base de datos KEGG. Los resultados fueron curados manualmente para eliminar múltiples cepas secuenciadas dentro de la misma especie o subespecie y asegurar que al menos cumplieran con el 30 % de identidad y 80 % de cobertura. Con base en el análisis, se encontraron 380 especies de bacterias distribuidas en 20 Phyla que potencialmente codifican cuando menos para alguna de las tres enzimas, siendo la ArgE la de mayor frecuencia (90 %), lo que es sorprendente, ya que se creó que la mayoría de las bacterias

sintetizan L-ornitina a partir de una NAO por medio de una ArgJ (Cuadro 9). Ninguna de las bacterias utiliza únicamente una HipO como “housekeeping” en la síntesis del intermediario, lo que sí sucede con la ArgE y ArgJ (8 y 3 %, respectivamente), indicando que dicha enzima no es parte de la ruta, pero que bajo ciertas circunstancias puede ser utilizada. Considerando lo anterior, se puede decir que el 25 % de las especies bacterianas cuyos genomas han sido secuenciados utilizan ArgE como base, sobresaliendo las γ -proteobacterias y los Bacteroidetes. Por otra parte, únicamente el 10 % utiliza una ArgJ, siendo las Cianobacterias y Chlorobi las que mejor ejemplifican dicha situación, mientras que en el porcentaje restante se desconoce cual de las dos enzimas asume ese papel. Es más interesante la presencia de las tres enzimas en la mayoría de las bacterias (51 %) como sucede en *S. meliloti*, lo que sugiere la importancia del aminoácido a nivel celular como precursor de distintos metabolitos.

Cuadro 9. Distribución de las enzimas ArgE, ArgJ y HipO en los Phyla bacterianos.

Phylum	Clase	ArgE ArgJ HipO	ArgE ArgJ	ArgE HipO	ArgJ HipO	ArgE	ArgJ
Acidobacteria		1	1	-	-	-	-
Actinobacteria		43	5	-	-	-	-
Aquificae		-	2	-	-	-	2
Bacteroidetes		-	-	2	-	2	-
Chlorobi		-	-	-	8	-	-
Chloroflexi		2	-	-	1	-	-
Chrysiogenetes		-	1	-	-	-	-
Cyanobacteria		-	-	-	8	-	-
Deferribacteres		2	-	-	1	-	-
Deinococcus-Thermus		6	2	-	-	-	-
Dictyoglomi		-	-	-	2	-	-
Fibrobacteres		-	1	-	-	-	-
Firmicutes		51	6	9	2	2	6
Fusobacteria		2	-	-	1	-	-
Gemmatimonadetes		1	-	-	-	-	-
Nitrospirae		-	-	-	-	-	1
Planctomycetes		1	-	-	-	-	-
	α	36	9	-	-	1	-
	β	12	11	1	-	-	-
Proteobacteria	γ	12	8	51	-	24	-
	ε	1	3	2	-	-	-
	Δ	13	4	1	3	1	2
	Acidithiobacillia	-	1	-	-	-	-
Spirochaetes		5	1	-	-	-	-
Thermotogae		4	-	-	-	-	-
Total		192	55	66	26	30	11

6.8 REGULACIÓN GENÉTICA DE LA BIOSÍNTESIS DE L-ARGININA EN *S. meliloti*.

En *S. meliloti* los genes *argB*, *argE* y *argJ*, no son regulados a nivel genético con base en los resultados de los ensayos transcripcionales con el gen reportero *gusA*, lo que es similar a lo reportado en *P. aureginosa* (Figura 10b y c), donde únicamente los genes *argD*, *argF* y *carAB* son regulados por ArgR de la familia de reguladores AraC/Xyls (Park et al., 1997), reconociendo la secuencia consenso (TGTCGCN₈AA) (Nishijyo et al., 1998). Esto difiere de lo encontrado en *E. coli*, donde el gen *argA* puede ser regulado tanto por ArgR reconociendo la secuencia consenso TNTGAATWWWATTTCANW (Rodríguez-García et al., 1997) como por un regulador en respuesta a L-leucina (Lrp) (Cho et al., 2011), mientras que los genes *argECBH*, *argD*, *argF* y *argG* son regulados únicamente por ArgR (Figura 10a). Debido a la falta de ensayos de regulación transcripcional en los genes *argC*, *argDF*, *argF*, *argG*, *argH* y el desconocido *argA*, por el momento es imposible determinar si existe regulación a nivel genético en esta vía en *S. meliloti*.

6.9 *S. meliloti* PRESENTA LA VÍA DEL RECICLAJE.

En *S. meliloti* la vía de biosíntesis de L-arginina procede principalmente a través del reciclaje del grupo acetilo de la NAO por medio de la ArgJ, formando NAG en presencia de L-glutamato, donde el flujo metabólico es regulado a nivel bioquímico por la inhibición alostérica de la ArgB con L-arginina y de forma competitiva por L-ornitina en la ArgJ (Figura 10d) (Hernández et al., 2015). Además, la ruta presenta redundancia genética al nivel de la síntesis de L-ornitina (Hernández et al., 2015) y L-arginina (diCenzo y Finan, 2015). Algo similar sucede en *P. aureginosa* (Figura 10b), donde la síntesis del aminoácido procede a través del mismo tipo de ruta, con redundancia genética en la síntesis de L-ornitina (Jacobs et al., 2003), pero difiere en su regulación, ya que puede ser a nivel genético por medio de la ArgR (Nishijyo et al., 1998) en los genes *argF*, *argG* y *carAB* (Park et al., 1997); y a nivel bioquímico por la inhibición alostérica de la ArgA y ArgB por L-arginina (Ramón-Maiques, et al., 2002; 2006). Sin embargo, en *E. coli* la síntesis del aminoácido ocurre por medio de la vía lineal (Figura 10a), donde el grupo acetilo se pierde en forma de acetato a través de la ArgE (Javid-Majd y Blanchard, 2000) y el flujo metabólico puede ser regulado a nivel genético en cada uno de los genes *arg* por medio de la ArgR (Rodríguez-García et al., 1997) y por un

Lrp en *argA* (Cho et al., 2011). Además, a nivel bioquímico por la inhibición alostérica de la ArgA (Shi et al., 2008) con L-arginina. En *E. coli* también existe redundancia genética en la ruta, pero en la síntesis de la NAO (Lal et al., 2014). Finalmente, *X. campestris* (Figura 10c) utiliza la vía de la N^2 -acetilornitina, donde la síntesis de los dos primeros intermediarios procede por medio de una enzima bifuncional (ArgAB) siendo además, el punto de regulación a nivel bioquímico por la inhibición alostérica con L-arginina (Qu et al., 2007; Shi et al., 2011). Adicionalmente, la carbamoilación es realizada directamente en la NAO por medio de un ArgF' formado N^2 -acetilcitrulina, que es desacetilada por una ArgE (Morizono et al., 2006; Shi et al., 2005; 2006; 2007).

A pesar de que de forma general la biosíntesis de L-arginina es clasificada en tres tipos distintos, cada especie analizada presenta alguna peculiaridad, por presentar redundancia genética en la síntesis de algún intermediario o por su sistema de regulación, ya sea nivel genético o bioquímico. Conforme las investigaciones en el estudio de la biosíntesis de L-arginina en otras especies bacterianas se sigan elucidando, probablemente aparecerán más variaciones y con ellas nuevas vías.

Figura 10. Esquema de las rutas de la biosíntesis de L-arginina presentes en *E. coli* (a) (Lal et al., 2014; Rodríguez-García et al., 1997; Shi et al., 2008; Cho et al., 2011), *P. aurescens* (b) (Nishijyo et al., 1998; Park et al., 1997; Ramón-Maiques, et al., 2002; 2006); *X. campestris* (Qu et al., 2007; Morizono et al., 2006; Shi et al., 2005; 2006; 2007; 2011) (c) y *S. meliloti* (d) (Hernández et al., 2015; diCenzo y Finan, 2015). Los cuadros en color verde indican la regulación a nivel genético por medio de un ArgR y en rojo por Lrp, los círculos en color magenta la regulación a nivel bioquímico por medio de L-arginina y en color naranja por L-ornitina. El gen *hipO* en color gris de *P. aurescens* no ha sido caracterizado.

7. CONCLUSIONES

- a) Basados en los ensayos de actividad enzimática tanto de la proteína recombinante purificada como del extracto total de *S. meliloti*, donde la ArgJ mostró que únicamente puede utilizar NAO para sintetizar NAG y aunado a los ensayos de complementación heteróloga en una cepa mutante *argE* de *E. coli* se determinó que la enzima es monofuncional.
- b) Derivado de los ensayos enzimáticos con L-glutamato marcado radiactivamente donde se confirmó la actividad sintasa en la formación de NAG se concluyó que *S. meliloti* cuenta con una Arg(A).
- c) Como resultado de los ensayos de actividad enzimática de la proteína recombinante purificada ArgB de *S. meliloti* en presencia de L-arginina, donde el aminoácido inhibe de forma alostérica a la enzima, impidiendo la síntesis del NAG-5-fosfato y por consecuencia de L-arginina, se determinó que es el punto de regulación del flujo metabólico a nivel bioquímico en la vía.
- d) Además de la participación de la ArgJ en la síntesis de L-ornitina, las enzimas ArgE y HipOs también pueden realizar la misma función, lo cual fue demostrado por los ensayos de actividad enzimática con las proteínas recombinantes y corroborado *in vivo* por los ensayos de complementación heteróloga en una cepa mutante *E. coli*, por lo que se determinó que existe redundancia genética en la síntesis del intermediario en *S. meliloti*.
- e) A pesar de que a nivel de secuencia de aminoácidos la proteína ArgE y HipO tienen baja identidad (22 %), son homólogas, ya que realizan la misma función en la bacteria y tienen la misma estructura.
- f) Basados en los ensayos de regulación transcripcional con el gen reportero *gusA*, donde los genes *argB*, *argE* y *argJ*, no reducen su nivel de expresión en presencia de L-arginina, se determinó que no existe regulación genética de estos genes en la vía de biosíntesis de L-arginina en *S. meliloti*.
- g) Debido a que la regulación de la ruta a nivel bioquímico es por medio de la inhibición alostérica de la ArgB por L-arginina y la síntesis de L-ornitina procede por la desacetilación

de la NAO por medio de la ArgJ principalmente, se determinó que *S. meliloti* presenta la vía del reciclaje.

8. PERSPECTIVAS

- a) Debido a que la proteína Arg(A) no fue identificada con las metodologías empleadas, se sugiere realizar ensayos de actividad enzimática con fracciones del extracto total de *S. meliloti* utilizando cromatografía líquida acoplado a un espectrómetro de masas (MS) para la detección del NAG y la identificación de la enzima debe ser realizada por medio de un gel de dos dimensiones en conjunto con un MS.
- b) Para determinar si las proteínas encontradas en la síntesis de L-ornitina son las únicas en *S. meliloti*, se sugiere construir una cepa mutante en los cinco genes (*argE*, *argJ*, *hipO1*, *hipO2* y *hipO3*) por medio del sistema de mutagénesis Cre/*lox* y determinar su crecimiento en MSA.
- c) Para determinar si existe o no regulación a nivel genético en la ruta de biosíntesis de L-arginina en *S. meliloti*, se sugiere realizar fusiones transcripcionales con el gen reportero *gusA* de los genes *arg* restantes y *carAB*; y determinar su nivel de expresión en MSA con y sin L-arginina.

Genetic and biochemical characterization of arginine biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* 1021

Victor M. Hernández,¹ Lourdes Girard,² Ismael Hernández-Lucas,³ Alejandra Vázquez,³ Catalina Ortiz-Ortiz,¹ Rafael Díaz¹ and Michael F. Dunn¹

Correspondence
Michael F. Dunn
mike@ccg.unam.mx

¹Programa de Genómica Funcional de Procariotes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos C. P. 62210, Mexico

²Programa de Dinámica Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos C. P. 62210, Mexico

³Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos C. P. 62210, Mexico

L-Ornithine production in the alfalfa microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* occurs as an intermediate step in arginine biosynthesis. Ornithine is required for effective symbiosis but its synthesis in *S. meliloti* has been little studied. Unlike most bacteria, *S. meliloti* 1021 is annotated as encoding two enzymes producing ornithine: *N*-acetylornithine (NAO) deacetylase (ArgE) hydrolyses NAO to acetate and ornithine, and glutamate *N*-acetyltransferase (ArgJ) transacetylates L-glutamate with the acetyl group from NAO, forming ornithine and *N*-acetylglutamate (NAG). NAG is the substrate for the second step of arginine biosynthesis catalysed by NAG kinase (ArgB). Inactivation of *argB* in strain 1021 resulted in arginine auxotrophy. The activity of purified ArgB was significantly inhibited by arginine but not by ornithine. The purified ArgJ was highly active in NAO deacetylation/glutamate transacetylation and was significantly inhibited by ornithine but not by arginine. The purified ArgE protein (with a 6His-Sumo affinity tag) was also active in deacetylating NAO. *argE* and *argJ* single mutants, and an *argEJ* double mutant, are arginine prototrophs. Extracts of the double mutant contained aminoacylase (Ama) activity that deacetylated NAO to form ornithine. The purified products of three candidate *ama* genes (*smc00682* (*hipO1*), *smc02256* (*hipO2*) and *smb21279*) all possessed NAO deacetylase activity. *hipO1* and *hipO2*, but not *smb21279*, expressed *in trans* functionally complemented an *Escherichia coli* $\Delta argE::Km$ mutant. We conclude that Ama activity accounts for the arginine prototrophy of the *argEJ* mutant. Transcriptional assays of *argB*, *argE* and *argJ*, fused to a promoterless *gusA* gene, showed that their expression was not significantly affected by exogenous arginine or ornithine.

Received 10 April 2015
Revised 8 June 2015
Accepted 12 June 2015

INTRODUCTION

Rhizobia are Gram-negative bacteria that reduce atmospheric nitrogen to ammonia in symbiotic association with leguminous plants. L-Amino acid synthesis by rhizobia is generally crucial for the establishment and/or maintenance

Abbreviations: Ama, aminoacylase; Arg(A), *N*-acetylglutamate synthase short form; ArgB, *N*-acetylglutamate kinase; ArgC, *N*-acetylglutamyl phosphate reductase; ArgE, *N*-acetylornithine deacetylase; ArgJ, glutamate *N*-acetyltransferase; DTNB, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid); HipO1, HipO2 and SM_b21279, putative hippurate hydrolases; NAG, *N*-acetylglutamate; NAO, *N*-acetylornithine.

One supplementary table is available with the online Supplementary Material.

of a nitrogen-fixing symbiosis. In the alfalfa microsymbiont *Sinorhizobium meliloti*, mutants defective in the early steps of the arginine pathway (ornithine/arginine auxotrophs) are symbiotically defective, while those blocked in later steps (ornithine prototrophs/arginine auxotrophs) are effective, indicating that ornithine is especially important in symbiosis (Dunn, 2015).

Ornithine is produced in *S. meliloti* as an intermediate in arginine biosynthesis and as a product of arginine degradation (Dunn, 2015). Besides arginine, metabolites derived from ornithine include polyamines (Shaw *et al.*, 2010), ornithine-containing lipids (López-Lara *et al.*, 2005) and proline (Soto *et al.*, 1994a, b). We hypothesize that a reduced ability to synthesize polyamines, which are required for the

normal growth of rhizobia (Shaw 2011), explains why *S. meliloti* ornithine auxotrophs are symbiotically defective (Arteaga & Dunn, 2015; Dunn, 2015).

Several variations in the enzymic steps converting glutamate to arginine exist in bacteria, making it an attractive model for studying genetic and biochemical regulation (Cunin *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 2007). Arginine biosynthesis begins with the transfer of the acetyl group from acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) to glutamate, forming *N*-acetylglutamate (NAG). This reaction is catalysed by NAG synthase (EC 2.3.1.1), which may occur as either a full-length form, designated ArgA, or as a truncated form called Arg(A). NAG can also be made by a bifunctional glutamate *N*-acetyltransferase (ArgJ; EC 2.3.1.35) that synthesizes NAG *de novo* from glutamate and acetyl-CoA and, in the fifth step of the pathway, deacetylates *N*-acetylornithine (NAO) to form ornithine. Monofunctional ArgJs perform only the NAO deacetylation/glutamate transacylation reaction and cannot synthesize NAG *de novo*. Mono- and bifunctional ArgJs recycle the acetyl group from NAO by adding it to glutamate, forming NAG. Bacteria using a mono- or bifunctional ArgJ to deacetylate NAO possess what is called an acetyl group recycling pathway, which occurs in diverse prokaryotic taxa. Of more limited occurrence are bacteria (mostly enterics) with a linear arginine pathway, in which NAO is deacetylated by NAO deacetylase (ArgE; EC 3.5.1.16), with loss of the acetate group to the environment. Most bacteria have only ArgE or ArgJ, and can thus be unambiguously classified as having the linear or recycling pathway, respectively. While the co-occurrence of both enzymes in the same organism is rare, it occurs in the model laboratory organisms *Pseudomonas aeruginosa* and *Corynebacterium glutamicum* (Xu *et al.*, 2007).

The biochemical regulation of the linear and recycling pathways differs. In the second step of arginine synthesis, NAG kinase (ArgB; 2.7.2.8) phosphorylates NAG to form *N*-acetyl-L-glutamyl-5-phosphate. In bacteria with the recycling pathway, arginine allosterically inhibits ArgB (a homohexamer). In the linear pathway, the target of arginine inhibition is ArgA, and the ArgB (a homodimer) is arginine insensitive (Xu *et al.*, 2007).

The predicted *S. meliloti* 1021 arginine biosynthesis pathway (Fig. 1) contains both ArgE and ArgJ (Dunn, 2015), which are non-homologous isofunctional enzymes, rather than isoforms derived from a common ancestral form (Omelchenko *et al.*, 2010). Because ArgE is the only enzyme of the predicted pathway encoded on a megaplasmid, it was suggested to have an ancillary role in ornithine production (Barnett *et al.*, 2001). ArgJ is annotated as a bifunctional enzyme in the *S. meliloti* genome sequence (Capela *et al.*, 2001) and would thus synthesize NAG *de novo* as well as deacetylate NAO. NAG synthesis by a bifunctional ArgJ could be essential for initiating arginine synthesis in *S. meliloti* 1021, which lacks *argA*. Strain 1021 encodes several *arg(A)* candidates but individual inactivation

of these genes did not cause arginine auxotrophy (Madrid, 2013). The presumed presence of a bifunctional ArgJ would make the activity of an Arg(A) unnecessary or purely anaplerotic (Xu *et al.*, 2007).

Arginine synthesis has been intensively studied in *P. aeruginosa* and *C. glutamicum*, but the relative participation of their ArgE and ArgJ enzymes in NAO deacetylation has not been addressed. Because ornithine is essential for a functional *S. meliloti*-alfalfa symbiosis, our aim here was to characterize the strain 1021 arginine synthesis pathway to: (i) determine the relative participation of ArgE and ArgJ in NAO deacetylation; (ii) experimentally demonstrate the mono- or bifunctionality of ArgJ and its regulatory properties; (iii) determine the arginine sensitivity of ArgB; and (iv) establish whether *argB*, *argE* and *argJ* were transcriptionally regulated in response to exogenous arginine or ornithine.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and culture growth conditions.

Bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. PY and LB complex media, minimal medium with succinate and NH₄Cl as carbon and nitrogen sources, respectively (MMS) and minimal medium M9 were prepared as described previously (Dunn *et al.*, 2001). For growth analysis, *S. meliloti* and *E. coli* strains were grown in 50 ml portions of medium without antibiotics in 125 ml baffled flasks with agitation at 200 r.p.m. at 30 °C and 37 °C, respectively. When needed for strain selection, antibiotics were used at the following final concentrations (µg ml⁻¹): carbenicillin (Cb), 50; chloramphenicol (Cm), 100; gentamicin (Gm), 15; kanamycin (Km), 50; nalidixic acid (Nal), 20; neomycin (Nm), 60; spectinomycin (Sp), 100; streptomycin (Sm), 200. Amino acid supplements were prepared as filter-sterilized, 0.5 M pH 6.8 stocks. Standard protocols were used to grow *E. coli* for genetic manipulations (Sambrook *et al.*, 1989).

PCR amplification and DNA manipulations. PCR primers (Table S1, available in the online Supplementary Material) were used in PCRs with Accuprime *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) to clone genes whose products were to be purified, or with Dream *Taq* Green PCR master mix (Fermentas) for other purposes. PCR cycling programs included a denaturing step at 95 °C for 1 min followed by 30 cycles of 95 °C for 1 min, 56 °C for 1 min and 72 °C for a time appropriate for the length of the DNA being amplified. A final elongation step was made at 72 °C for 10 min. DNA isolation, restriction digests, cloning and transformation were performed by standard methods (Sambrook *et al.*, 1989) or using commercially available kits. Bacterial conjugations and high-stringency DNA hybridizations were performed as described previously (Girard *et al.*, 2000). The stability of insertion elements and plasmids in cultures was confirmed by antibiotic resistance screening and plasmid profile analysis, Southern hybridization and/or PCR to detect the presence of insertions (Zamorano-Sánchez *et al.*, 2012), and by enzymic assays to confirm the absence of the relevant enzyme in mutants.

DNA and protein sequence analysis. DNA and protein sequences were obtained from the Rhizobase (<http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>) and UniProtKB (www.uniprot.org) servers and sequence alignments made with the CLUSTAL W program (Thompson *et al.*, 1994) at the Network Protein Sequence Analysis server (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalwan.html). Additional protein sequence analysis was performed via the Prosite web server (<http://prosite.expasy.org/>).

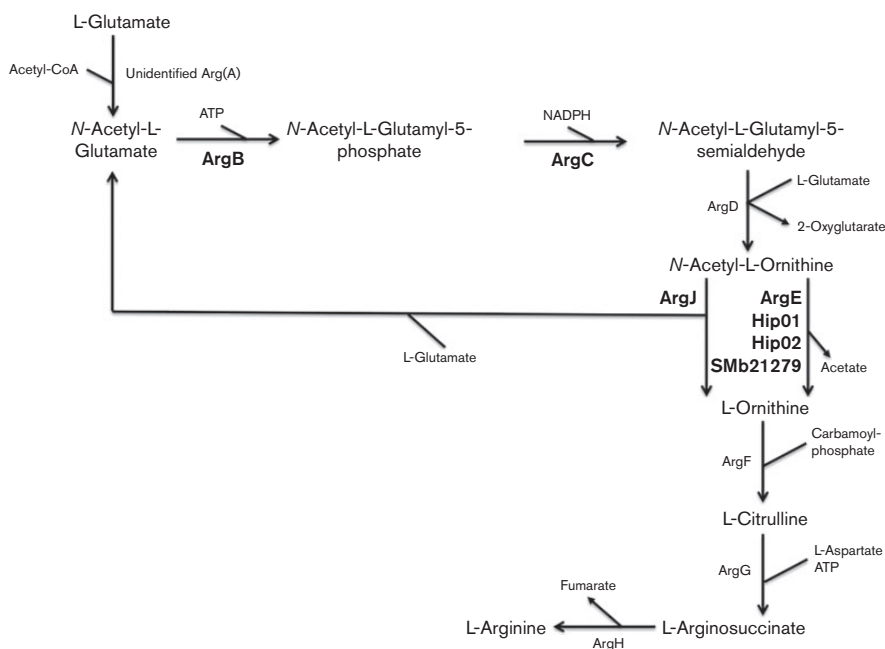


Fig. 1. Arginine biosynthesis in *S. meliloti* 1021 as deduced from this work. Enzymes discussed in this paper are shown in bold face. Abbreviations: Arg(A), *N*-acetylglutamate synthase short form; ArgB, *N*-acetylglutamate kinase; ArgC, *N*-acetylglutamyl phosphate reductase; ArgD, acetylornithine/succinyldiaminopimelate aminotransferase; ArgJ, monofunctional glutamate *N*-acetyltransferase; ArgE, *N*-acetylornithine deacetylase; ArgF, anabolic ornithine carbamoyltransferase; ArgG, arginosuccinate synthase; ArgH, arginosuccinate lyase; HipO1, HipO2 and SMb21279, enzymes annotated as hippurate hydrolases that deacetylate *N*-acetylornithine.

Cell culture and extract preparation. Cultures for extract preparation were grown in MMS with or without exogenous arginine or ornithine (1 mM final concentration) for 18 h at 30 °C, 200 r.p.m. prior to harvest. Cell-free protein extracts were obtained by sonication (Dunn *et al.*, 2001) in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8) containing 10 % glycerol (and 1 mM reduced glutathione (GSH) for assays of ArgE/Ama and ArgJ) followed by centrifugation at 12 100 g. Low-molecular mass metabolites were removed on BioGel P6-DG (Bio-Rad) desalting columns prior to assay.

Enzyme assays. All reactions were incubated at 30 °C, except for the 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)-based ArgA (NAG synthase) assay, performed at room temperature. For all assays, 1 U of enzyme activity equals 1 nmol of product min⁻¹ mg protein⁻¹.

NAO deacetylase (ArgE) and aminoacylase (Ama) assays. These activities were assayed in 100 µl reactions, containing 100 mM potassium phosphate (KP) buffer (pH 8.0), 1 mM GSH, 0.2 mM CoCl₂ and 18 mM NAO. Reactions were started by adding extract or purified enzyme and ornithine formation quantified as described by Vogel & Bonner (1956) based on a standard curve. To determine enzyme metal ion requirements, enzyme samples were dialysed at 4 °C against 100 mM KP buffer (pH 8.0)/5 % (v/v) glycerol/1 mM EDTA, followed by dialysis versus the same buffer lacking EDTA. Stock solutions of CoCl₂, MnCl₂ and ZnSO₄ were prepared in water at a concentration of 20 mM. NAO deacetylation activities were determined in time-course reactions with or without a 0.2 mM final concentration of a divalent cation.

Glutamate *N*-acetyltransferase (ArgJ) assay. The standard assay reaction mixture contained 100 mM Tris/HCl (pH 7.5), 6 mM NAO and 6 mM L-glutamate (Kershaw *et al.*, 2002) in a total volume of 0.5 ml. Control reactions lacked glutamate. Reactions were started by adding enzyme, and ornithine formation was detected with ninhydrin (Vogel & Bonner, 1956) and quantified based on a standard curve. Activity of the purified ArgJ at varied L-glutamate concentrations was determined in reactions containing 0.13 µg enzyme, 30 mM NAO and 1, 2.5, 5, 10, 20 or 30 mM L-glutamate. Assays with varied NAO contained 60 mM glutamate and 0.6, 1.5, 4.8, 9.6, 19.8 or 30 mM NAO. Kinetic values were calculated from the linear regression equations derived from Lineweaver–Burk plots. Reactions were performed in duplicate and values presented are the mean ± SD for two independent experiments. Activity of the purified ArgJ in the presence of compounds not reacting with ninhydrin (NAG, L-arginine) was determined by adding pH-neutralized stocks of these compounds to the standard ArgJ reaction mixture at final concentrations of 0, 5, 20, 50 and 100 mM. L-citrulline reacts moderately with ninhydrin and was added to reactions at 0, 1, 2.5, 5 or 10 mM final concentration, with or without L-glutamate, and the absorbance of the glutamate-lacking reactions subtracted from the absorbance of the complete reactions. To determine ArgJ inhibition by L-ornithine, an ArgB-linked assay was used in which standard ArgJ reactions containing ornithine (0, 1, 2.5, 5 or 10 mM) were incubated at 30 °C for 1 h followed by heating at 95 °C for 10 min. NAG content of the stopped reactions was determined in duplicate ArgB assay reactions lacking NAG and containing 10 µg of purified *S. meliloti* ArgB-His (Dunn *et al.*, 2008) using the method described in the following section.

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i> strains		
BL21(DE3)	Strain for protein expression	Invitrogen
BL21(DE3) $\Delta argE::Km$	<i>argE</i> deletion mutant with Km^r gene replacing <i>argE</i>	This study
MC4100	Derivative of strain MG1655	Casadaban (1976)
MC4100 $\Delta argA::Km$	<i>argA</i> deletion mutant with Km^r gene replacing <i>argA</i>	This study
DH5 α	Cloning strain	Laboratory collection
<i>S. meliloti</i> strains		
1021	Sm^r derivative of WT strain SU47, Sm^r Nal ^r	Meade <i>et al.</i> (1982)
1021 <i>argJ</i>	1021 <i>argJ::</i> ΩKm , Nm^r	This study
1021 <i>argE</i>	1021 <i>argE::</i> ΩSp , Sp^r	This study
1021 <i>argEJ</i>	1021 <i>argE::</i> ΩSp <i>argJ::</i> ΩKm Sp^r Nm^r	This study
1021 <i>argB</i>	1021 <i>argB::loxSp</i> , Sp^r	This study
1021 <i>argC</i>	1021 <i>argC::</i> ΩSp	Diáz <i>et al.</i> (2011)
Plasmids*		
pBBR1MCS-5	Broad host range vector, Gm^r	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pBB5argB	pBBR1MCS-5 containing <i>argB</i> with native promoter and terminator regions, Gm^r	Dunn <i>et al.</i> (2008)
pBB5argJ	pBBR1MCS-5 containing <i>argJ</i> with native promoter and terminator regions, Gm^r	This study
pBBR1MCS-53	$\Delta placZ$ pBBR1MCS-5 derivative with promoterless <i>gusA</i> , Gm^r	Girard <i>et al.</i> (2000)
pBB53argB:: <i>gusA</i>	Transcriptional <i>argB::gusA</i> fusion in pBBR1MCS-53	This study
pBB53argE:: <i>gusA</i>	Transcriptional <i>argE::gusA</i> fusion in pBBR1MCS-53	This study
pBB53argJ:: <i>gusA</i>	Transcriptional <i>argJ::gusA</i> fusion in pBBR1MCS-53	This study
pBCSK	pBluescript BCSK(+) cloning vector, Cm^r	Stratagene
pBCSK-argJ	pBCSK(+) containing <i>argJ</i> and flanking nucleotides, Cm^r	This study
pBCSK-argJ:: ΩKm	pBCSK(+) containing <i>argJ::</i> ΩKm , Cm^r Km^r	This study
pET-17b	Cloning vector, Cb^r	Novagen
pET-17b-hipO1	<i>hipO1</i> cloned in pET-17b under control of the <i>lacZ</i> promoter, Cb^r	This study
pET-17b-hipO2	<i>hipO2</i> cloned in pET-17b under control of the <i>lacZ</i> promoter, Cb^r	This study
pET-17b-smb21279	<i>smb21279</i> cloned in pET-17b under control of the <i>lacZ</i> promoter, Cb^r	This study
pHP45 ΩSp	Source of ΩSp element	Prentki & Krisch (1984)
pHP45 ΩKm	Source of ΩKm element	Fellay <i>et al.</i> (1987)
pJQ200SK	Broad host range gene replacement vector, Gm^r	Quandt & Hynes (1993)
pJQargJ:: ΩKm	pJQ200SK containing <i>argJ::</i> ΩKm , Gm^r Km^r	This study
pK18mobsacB	Broad host range gene replacement vector, Km^r	Schäfer <i>et al.</i> (1994)
pK18argB:: <i>Sp</i>	pK18mobsacB containing <i>argB::</i> <i>Sp</i> , Km^r Sp^r	This study
pK18-argE	pK18mobsacB containing <i>argE</i> and flanking nucleotides, Km^r	This study
pK18-argE:: ΩSp	pK18mobsacB containing <i>argE::</i> ΩSp , Km^r Sp^r	This study
pMS102loxSp17	Source of the <i>Sp17</i> Sp^r element	Martinez-Salazar & Romero (2000)
pRK2013	Helper plasmid, Km^r	Figurski & Helinski (1979)
pRK2073	Helper plasmid, Sp^r	Yakobson & Guiney (1984)
pSK+	pBluescript II SK(+) cloning vector, Cb^r	Stratagene
pSumo	pET-Sumo expression vector for production of 6His-Sumo-tagged proteins, Km^r	Invitrogen
pSumo-argB	pET Sumo containing <i>argB</i>	This study
pSumo-argE	pET Sumo containing <i>argE</i>	This study
pSumo-argJ	pET Sumo containing <i>argJ</i>	This study
pSumo-hipO1	pET Sumo containing <i>hipO1</i>	This study
pSumo-hipO2	pET Sumo containing <i>hipO2</i>	This study
pSumo-smb21279	pET Sumo containing <i>smb21279</i>	This study
pTopo	pCR2.1TOPO vector for cloning PCR products, Km^r	Invitrogen
pTopo-argB	pCR2.1-Topo containing <i>argB</i> with flanking nucleotides, Km^r	This study
pTopo-argB:: <i>Sp</i>	pTOPO-argB with the <i>Sp17</i> Km^r element inserted into <i>argB</i> , Ap^r Km^r	This study
pTopo-argE	pCR2.1-Topo containing <i>argE</i> and flanking nucleotides, Km^r	This study
pTopo-argE1	pCR2.1-Topo containing the <i>argE</i> promoter and gene 5' sequence, Km^r	
pTopo-argJ	pCR2.1-Topo containing <i>argJ</i> and flanking nucleotides, Km^r	This study
pTopo-argJ-smc02449	pCR2.1-Topo containing <i>argJ</i> and adjacent Orf <i>smc02449</i> , and flanking nucleotides, Km^r	This study

*Unless otherwise noted, all cloned genes were obtained from *S. meliloti* 1021.

Reactions were incubated for 2 h prior to quantification. To determine the NAG synthase activity of the purified ArgI, the DNTB-based and ArgB-linked ArgA assays were used. ArgJ activity in desalted cell extracts was determined as described for the ArgE/Ama assay, except that reactions lacked CoCl_2 and contained 10 mM NAO and 6 mM L-glutamate.

NAG kinase (ArgB) assay. The ArgB enzymic product was measured as a N-acetyl-L-glutamyl-S-hydroxamate: Fe^{3+} complex at 540 nm (Haas & Leisinger, 1975a). Reactions were incubated at 30 °C for 30 min, and halted reactions were briefly centrifuged prior to determining their absorbance. The standard ArgB assay contained 40 mM NAG, 10 mM ATP and 20 mM MgCl_2 , initial pH 7.2, in a total volume of 0.5 ml. For kinetic studies, NAG was varied in twofold increments between 0.625 and 40 mM, and ATP was varied in twofold increments between 0.625 and 10 mM, with concentrations of the other reactants as in the standard assay. These assays contained 0.74 μg of purified ArgB and values reported are the mean \pm SD for triplicate assays.

β -Glucuronidase (Gus) and protein assays. Cultures for Gus assays were grown for 8 h at 30 °C with shaking at 200 r.p.m. Gus activity was determined in duplicate samples of permeabilized cells by measuring the production of *p*-nitrophenol from the *p*-nitrophenyl β -D-glucuronide substrate with quantification based on total protein (Girard *et al.*, 2000). Values are the mean \pm SD for two independent experiments. Protein concentrations were determined by the Bradford (1976) method.

Recombinant protein purification. *S. meliloti* genes cloned in pSumo (Invitrogen) are listed in Table 1 and were used to overexpress recombinant 6His-Sumo tagged proteins in *E. coli* BL21(DE3). Gene amplification with the primers described in Table S1 and cloning were performed following the manufacturer's protocol. For protein overexpression and purification, transformant cultures were grown in 100 ml LB Km at 37 °C, 200 r.p.m. to an OD_{620} of 0.6, IPTG was added to a final concentration of 0.5–1 mM and incubation continued for 6–24 h at 30 °C, 200 r.p.m. 6His-Sumo-tagged proteins were purified on Ni-NTA columns under native conditions and dialysed against 25 mM Tris/HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1 mM DTT at 4 °C overnight. Two hundred micrograms of dialysed protein was digested with 2–10 U of Sumo protease (Invitrogen) at 30 °C for 4 h. The protease and 6His-Sumo tag were removed by treatment with Ni-NTA matrix, yielding purified, tag-free enzyme in the non-binding fraction. The concentration of IPTG used for induction, incubation time post-induction and the amount of protease needed to produce good cleavage were determined empirically for each fusion protein.

S. meliloti mutant construction. To inactivate *argJ* (*smc02450*), its ORF with approximately 600 flanking nt was amplified from strain 1021 genomic DNA using primers *argJ*600-F and *argJ*600-R. This product was cloned by T-A annealing into pCR 2.1-TOPO to generate pTOPO-*argJ*. The insert was liberated from this plasmid with *Kpn*I and *Xba*I and cloned into pBCSK to give plasmid pBCSK-*argJ*. The Ω Km element from plasmid pHP45 Ω Km was inserted into the *Hind*III site of *argJ* (412 nt after the start codon) to generate pBCSK-*argJ*:: Ω Km. The *argJ*:: Ω Km insert was excised from this plasmid with *Bam*HI and *Xba*I and cloned into the positive-selection suicide vector pJQ200SK to form pJQargJ:: Ω Km. This plasmid was conjugated into *S. meliloti* 1021 and double recombinants isolated by sucrose selection as described by Zamorano-Sánchez *et al.* (2012). The mutant designated 1021*argJ* (Table 1) was used for further studies. To create the *argE* and *argEJ* mutants, the *argE* gene (*sma1836*) with flanking nt was amplified with primers *argE*-F and *argE*-R and the product cloned into pCR2.1-TOPO to create pTopo-*argE*. The *argE* region was excised with *Xba*I and *Bgl*II and cloned into the positive-selection suicide vector pK18mobsacB digested with *Bam*HI and *Xba*I to create plasmid pK18-*argE*. The Ω Sp fragment from pHP45 Ω Sp was inserted into the *Bam*HI site located 79 nt after the

argE start codon to generate pK18-*argE*:: Ω Sp. This plasmid was separately conjugated into *S. meliloti* 1021 and 1021*argJ* and double recombinants isolated as described for 1021*argJ* using the appropriate antibiotic selection. Single mutant 1021*argE* and double mutant 1021*argEJ* (Table 1) were used for further analysis. For *argB* mutagenesis, the *loxSp*17 (Sp^+) element excised from plasmid pMS102loxSp17 by *Sal*I digestion was inserted into the *Sal*I site of *argB* (*smc01726*) in pTopo-*argB* to obtain pTopo-*argB*::*loxSp*. The fragment *argB*::*loxSp* was removed with *Eco*RI and ligated with the positive-selection suicide vector pK18mobsacB digested with the same enzyme to obtain plasmid pK18-*argB*::*loxSp* (Table 1). This plasmid was conjugated into *S. meliloti* 1021 and double recombinants isolated as described above. Mutant 1021*argB* was used for further studies.

E. coli mutant construction. Δ *argA*::Km and Δ *argE*::Km mutants were constructed in *E. coli* strains MC1400 and BL21(DE3), respectively. The genes were deleted by a one-step nonpolar gene inactivation procedure using the PCR primers described in Table S1 and replaced with a selectable Km resistance gene marker (Datsenko & Wanner, 2000). Each construct was confirmed by PCR analysis utilizing the primers listed in Table S1.

Complementation analysis of E. coli mutants. For constructing plasmids pET-17b-hipO1, pET-17b-hipO2 and pET-17b-smb21279 (Table 1), the *S. meliloti* genes were amplified with primer pairs *phip*O1F/*phip*O1R, *phip*O2F/*phip*O2R and *psmb*21279F/*psmb*21279R, respectively (Table S1) and cloned into pTopo. The restriction sites introduced into the forward and reverse primers (Table S1) were used to insert the genes into the vector pET17-b under control of the vector's *lacZ* promoter. Plasmids were transformed into the *E. coli* Δ *argA*::Km and Δ *argE*::Km mutants, transformants were purified by restreaking on selective medium and the presence of the correct plasmid was verified by restriction enzyme digestion of isolated plasmids.

Construction of transcriptional fusions with the β -glucuronidase (*gusA*) gene. To construct plasmid pBB53argJ::gusA, a 360 nt 5' segment of *argJ*, along with 250 nt upstream of the initiation codon, were liberated from plasmid pTOPO-*argJ*-*smc02449* with *Eco*RI and *Sal*I and ligated into pBBR1MCS-53 cut likewise to fuse the 0.61 kb *argJ* fragment to the *gusA* gene of the vector. For plasmid pBB53argE::gusA, primers *argEgus*F and *argEgus*R were used to amplify a fragment spanning 474 nt upstream and 221 nt downstream of the *argE* initiation codon, using pTOPO-*argE* as a template. The PCR product was cloned into pTopo to create pTopo-*argE*1. The insert from this plasmid was excised using the *Xba*I and *Kpn*I sites introduced in the PCR and cloned into pBBR1MCS-53. For constructing pBB53argB::gusA, a fragment containing 186 nt upstream of the *argB* start codon and 487 nt of the coding sequence was excised from pBB53argB by digestion with *Eco*RI and *Sal*I. The fragment was cloned into pBBR1MCS-53 cut likewise. The correct transcriptional orientation of the cloned gene fragments in all of the *gusA* plasmid constructs was determined by restriction enzyme digest and by PCR analysis utilizing primer p53lw (reverse primer specific for *gusA*) and the relevant forward primer for the cloned *S. meliloti* gene (Zamorano-Sánchez *et al.*, 2012). The *gusA* fusion plasmids were transferred to *S. meliloti* 1021 by triparental mating.

RESULTS

ArgB is essential for arginine prototrophy and is sensitive to arginine inhibition

The *S. meliloti* 1021*argB* mutant did not grow in MMS (Fig. 2a) unless the medium was supplemented with 1 mM

ornithine (Fig. 2b) or arginine (results not shown). A 1021 *argC* mutant, previously reported to be an arginine auxotroph (Díaz *et al.*, 2011), also displayed the expected auxotrophy. ArgB activity in MMS cultures of the mutant was undetectable, while the activity in the WT was 37.1 ± 5.5 U (mean \pm SD for duplicate cultures). Complementation of mutant 1021*argB* with plasmid pBB5-argB resulted in high ArgB activity (287 ± 21 U; mean \pm SD for two independent experiments) and WT growth in unsupplemented MMS. In contrast, the mutant containing the empty vector was unable to grow and was devoid of ArgB activity (results not shown). In a separate experiment, the ArgB-specific activity in WT 1021 grown in MMS (41 ± 5 U) was not lowered when 1 mM arginine was included in the cultures (47 ± 9 U; mean \pm SD for two independent experiments), indicating that arginine does not repress ArgB synthesis. A lack of arginine repression has also been reported for *P. aeruginosa* ArgB (Haas & Leisinger, 1975a).

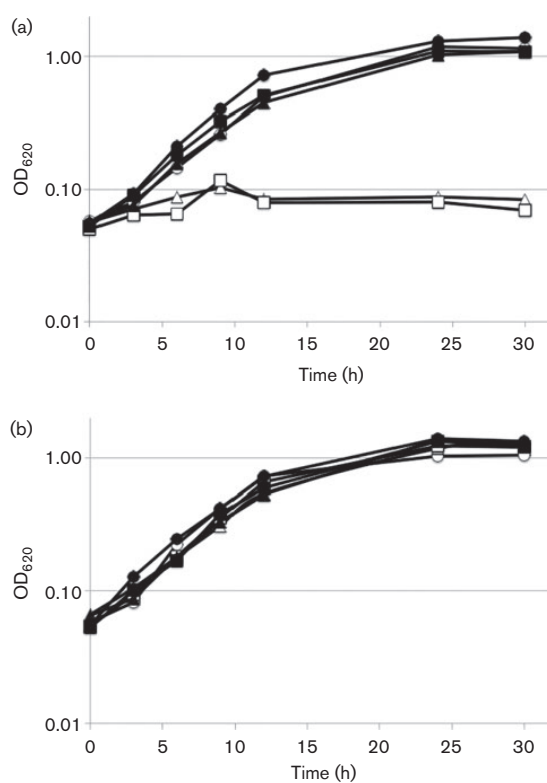


Fig. 2. Growth of *S. meliloti* WT and *arg* mutants in MMS. Results are the mean of two independent experiments where SEM of absorbance values differed by less than 10%. (a) MMS; (b) MMS with 1 mM L-ornithine. Symbols: 1021 WT, ○; 1021*argB*, △; 1021*argC*, □; 1021*argE*, ●; 1021*argJ*, ▲; 1021*argEJ*, ■.

Based on its deduced amino acid sequence, *S. meliloti* ArgB has a molecular mass of 31.2 kDa. Our previous characterization of the enzyme showed that it is a homohexamer composed of approximately 33 kDa subunits (Dunn *et al.*, 2008). Its deduced amino acid sequence is about 47 % identical to the hexameric (arginine-inhibited) ArgB from *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000).

Kinetic analysis of the purified ArgB gave apparent K_m s for NAG and ATP of 2.01 ± 0.3 and 1.97 ± 0.5 mM, respectively, and an apparent V_{max} of 232080 ± 3200 U. In standard assay reactions, ArgB activity was 50 % inhibited by 0.90 ± 0.04 mM arginine, while ornithine had no effect up to the maximum concentration tested (4 mM). In the presence of 1 mM arginine, the enzyme's K_{mNAG} increased 3.5-fold (to 7.03 ± 0.80 mM) while its K_{mATP} increased only 1.25-fold (to 2.47 ± 0.50 mM). Arginine decreased the enzyme's V_{max} by 31 % (to $150\,980 \pm 280$ U). These results agree with those reported for other hexameric ArgBs, where arginine inhibits activity mostly by lowering the affinity for NAG (Fernández-Murga *et al.*, 2004; Haas & Leisinger, 1975a, b; Lohmeier-Vogel *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2012).

Sequence and experimental analysis for possible polar effects on neighbouring gene expression in the strain 1021 *argB*, *argE* and *argJ* insertion mutants

The genome context of *argB* shows that it is followed by a divergently transcribed gene (*smc01727*) encoding a hypothetical protein, making unlikely any polar effects of the Ω Km insertion in *argB* on neighbouring gene expression.

The *argE* and downstream *smc1838* likely form an operon based on the prediction of the database Microbes Online Operon Predictions for *Sinorhizobium meliloti* 1021 (<http://meta.microbesonline.org/operons/gnc266834.html>), meaning the transcriptional terminators in the Ω Km inserted in *argE* probably prevent transcription of *smc1838*. The latter gene is annotated as encoding a dehydrogenase of unknown function, but belonging to COG111, phosphoglycerate dehydrogenase and related dehydrogenases. *S. meliloti* encodes a chromosomal phosphoglycerate dehydrogenase (SerA) likely participating in serine biosynthesis (Dunn, 2015). The prototrophy of the *argE* mutant (see below), which may also lack the dehydrogenase, argues against the participation of Sma1838 in the production of serine or another metabolite required for growth.

The *argJ* gene is annotated as being overlapped by *smc02449*, whose possible ATG start codon begins 29 nt upstream of the *argJ* termination codon. To determine the possible polar effect of the Ω Km insertion in *argJ* on *smc02449* transcription, we fused the 5' half of the latter gene to *gusA* in plasmid pBBR1MCS53, with the insert also containing the upstream *argJ* plus its promoter region, with or without the Ω Km insert in the *argJ* coding sequence. Gus expression from both plasmids separately introduced into strain 1021 was easily detectable

and present at the same level for each during growth in LB or MMS media (results not shown). Protein expression studies with *smc02449* cloned into the vector pET-Sumo, with the insert initiating from its annotated start codon, or an alternative ATG start codon occurring some 150 nt downstream, resulted in expression only in the construct initiating with the alternative start codon (results not shown). Together, these results indicate that *argJ* and *smc02449* do not overlap and that the transcription of the latter gene is not affected by the Ω Km insertion in *argI*.

ArgE and ArgJ are dispensable for arginine biosynthesis

To determine whether both ArgE and ArgJ participate in or are essential for arginine biosynthesis, we characterized the growth of mutants in which *argE* (strain 1021*argE*), *argJ* (strain 1021*argJ*) or both (strain 1021*argEJ*) were inactivated. In unsupplemented MMS (Fig. 2a), strains 1021*argJ* and 1021*argEJ* grew like WT and reached equal final cell densities, while strain 1021*argE* grew better than WT and reached a slightly higher final density. Growth of the WT and mutants was not significantly different in MMS containing ornithine (Fig. 2b) or arginine (results not shown) in comparison to unsupplemented medium. Thus, inactivation of *argE*, *argJ*, or both genes does not cause arginine auxotrophy or marked growth defects in *S. meliloti*.

Aminoacylase activity in S. meliloti 1021, 1021*argE* and 1021*argEJ*

The arginine prototrophy of the 1021*argEJ* mutant suggested the presence of an alternative NAO deacetylating activity able to functionally replace the missing ArgE and ArgJ activities. Using a ninhydrin-based assay to detect ornithine production from NAO, aminoacylase (Ama) activity was shown to be present in the double mutant (Table 2). Because ArgE and Ama activities cannot be distinguished with this assay, we compared the combined activities in the 1021 WT with those in 1021*argE* and 1021*argEJ*, in which the *argE* gene is inactivated. ArgJ activity is not detected in this assay because it requires glutamate. The NAO deacetylating specific activities in strains 1021*argE* and 1021*argEJ* grown in MMS were 0.68 and 0.64 U, respectively, or 52–55 % of that of the WT. In the mutants, these activities represent Ama, while the additional approximate 0.6 U of ArgE/Ama activity in the WT represents ArgE. Thus, the total ArgE plus Ama activity in strain 1021 (1.24 U) is split about equally between Ama and ArgE. In strains 1021*argE* and 1021*argEJ*, exogenous arginine in the culture increased Ama activity about 1.4-fold, but did not alter ArgE/Ama specific activity in the WT. Ornithine supplementation did not significantly alter ArgE/Ama activity in any of the strains (Table 2).

ArgE/Ama activity in strain 1021 was present at less than 10 % that of ArgJ activity. In strain 1021*argE*, ArgJ-specific activity in unsupplemented medium was about 1.5-fold higher than

Table 2. NAO deacetylating activities in extracts prepared from *S. meliloti* 1021 WT and the *argE* and *argEJ* mutants

Strain	Medium amino acid supplement	Specific activity (U)*	
		ArgE/Ama	ArgJ
1021	None	1.24 ± 0.15	14.0 ± 1.7
	Ornithine	1.16 ± 0.09	13.9 ± 1.3
	Arginine	1.24 ± 0.16	14.4 ± 0.2
1021 <i>argE</i>	None	0.68 ± 0.09	22.2 ± 1.5
	Ornithine	0.62 ± 0.01	18.3 ± 0.6
	Arginine	0.93 ± 0.02	20.4 ± 0.2
1021 <i>argEJ</i>	None	0.64 ± 0.17	NA†
	Ornithine	0.54 ± 0.01	NA†
	Arginine	0.92 ± 0.06	NA†

*Values are the mean ± SD for three independent experiments.

†No activity detected.

WT, which could be a cause or consequence of the enhanced growth of this mutant. As expected, ArgJ activity was undetectable in strains 1021*argEJ* (Table 2) and 1021*argJ* (not shown). These data support the notion that strain 1021*argEJ* is an arginine prototroph due to Ama activity.

ArgJ activity in the WT or strain 1021*argE* was unaffected by exogenous ornithine or arginine in the medium (Table 2). Exogenous arginine (5 mM) did not affect ArgJ production in *C. glutamicum* (Sakanyan *et al.*, 1996) but lowered ArgJ specific activity by 50–75 % in cultures of *Terminus thermophilus* and *Geobacillus stearothermophilus* (Baetens *et al.*, 1998; Sakanyan *et al.*, 1993a). Ornithine supplementation did not affect ArgJ production in *T. thermophilus* (Baetens *et al.*, 1998; Sakanyan *et al.*, 1992).

The S. meliloti HipO1, HipO2 and SM_b21279 proteins possess Ama activity

The finding that *S. meliloti* has NAO deacetylating activity apart from that produced by ArgJ and ArgE (Table 2) led us to search for the gene(s) encoding this activity. The *G. stearothermophilus* aminoacylase Ama1 (GenBank accession no. X74289) deacetylates NAO *in vitro* and *ama1* complements the growth defect of an *E. coli argE* mutant (Sakanyan *et al.*, 1993b). BLASTP analysis of *S. meliloti* 1021 with Ama1 as the query sequence returned the putative hippurate hydrolases HipO1, HipO2 and SM_b21279 as the only proteins with significant amino acid sequence identity/similarity (30.9–38.2 % to Ama1, as a group). Amino acid residues shown by site-directed mutagenesis to be involved in metal cation-binding and catalysis of a *Pyrococcus horikoshii* Ama (Tanimoto *et al.*, 2008) are conserved in all four proteins. The three *S. meliloti* putative hippurate hydrolases share 45.5–49.1 % amino acid identity with one another, but less than 20 % identity with the *S. meliloti* ArgE. They all contain seven of the eight

ArgE/DapE/Cpg2 family sequence signature residues occupied by an identical or functionally similar amino acid.

The *S. meliloti* putative hippurate hydrolases were cloned, overexpressed as 6His-Sumo fusions and obtained in purified form following removal of the affinity tag. Enzyme assays showed NAO deacetylation specific activities of 549 ± 19 , 219 ± 19 and 460 ± 5 U, respectively, for HipO1, HipO2 and SM_b21279 (mean \pm SEM for triplicate assays).

The *hipO1*, *hipO2* and *smb21279* genes were separately cloned into pET-17b and introduced into the *E. coli* BL21(DE3) Δ argE::Km mutant (Table 1). In M9 medium, the *hipO1*-complemented mutant grew nearly as well as the BL21(DE3) WT (Fig. 3). Complementation of the mutant with *hipO2* resulted in a much-reduced growth rate, but only slightly reduced growth yield after 24 h, in comparison with the *hipO1*-complemented mutant. The *smb21279*-complemented mutant did not grow. In the complementation tests, all of the strains grew well on M9 medium supplemented with ornithine (results not shown). None of the plasmids restored the growth of the *E. coli* MC1400 Δ argA::Km mutant. In contrast, the *Campylobacter jejuni* TGH9011 *hipO* (EMBL accession Z36940) functionally complements both *E. coli* *argA* and *argE* mutants (Hani *et al.*, 1999) and has 42–44 % amino acid identity to the three HipO proteins from *S. meliloti*. Together, the enzyme activity and complementation data are consistent with one or more of the HipO enzymes being responsible for the arginine prototrophy of *S. meliloti* 1021argEJ.

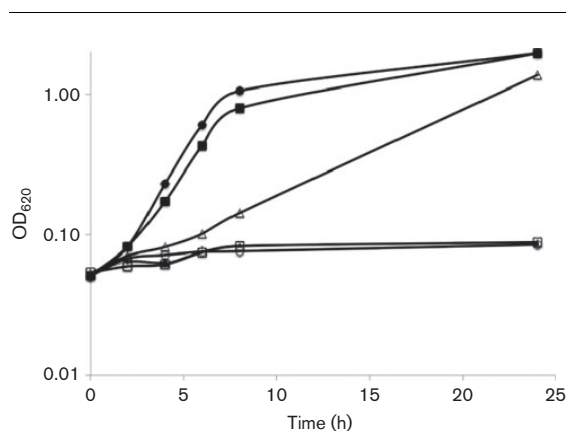


Fig. 3. Growth of the *E. coli* BL21(DE3) Δ argE::Km mutant complemented with cloned *S. meliloti* putative hippurate hydrolase genes in M9 minimal medium. Results are the mean of two independent experiments where SEM of absorbance values differed by less than 15%. Symbols: BL21(DE3) WT, ●; BL21(DE3) Δ argE::Km, ○; BL21(DE3) Δ argE::Km/pET-17b, □; BL21(DE3) Δ argE::Km/pET-17b-*hipO1*, ■; BL21(DE3) Δ argE::Km/pET-17b-*hipO2*, △; BL21(DE3) Δ argE::Km/pET-17b-*smb21279*, ▲.

ArgJ is a monofunctional enzyme sensitive to ornithine inhibition

S. meliloti ArgJ-deduced protein sequence (413 aa) contains active site and heterotetramer interface site residues characteristic of the ArgJ family (Pfam PF01960), including a predicted autoproteolysis site between A194 and T195. Other ArgJs have been shown to undergo autoproteolysis, resulting in α and β polypeptides containing the N and C terminal portions, respectively, of the enzyme (Kershaw *et al.*, 2002; Marc *et al.*, 2000). *S. meliloti* ArgJ purified as two peptides with molecular masses of 23 and 25 kDa (Table 3), consistent with autoproteolysis occurring between A194/T195, which would generate α and β polypeptides with predicted masses of 20 and 23 kDa, respectively. The experimentally determined ArgJ native molecular mass of 88 kDa is within the range reported for other bacterial ArgJs (Table 3) and fits most closely with a $\alpha 2\beta 2$ quaternary structure.

The apparent V_{\max} of the purified ArgJ was one to two orders of magnitude lower than that of the other bacterial ArgJs (Table 3) but 90-fold higher than that of the yeast enzyme. The apparent affinities of the *S. meliloti* enzyme for its substrates were greater than those of the other enzymes. Like the other characterized ArgJs, the activity of the *S. meliloti* enzyme was significantly inhibited by L-ornithine (Table 3) but not by physiological levels of NAG or L-arginine (I_{50} values of 22 and 62 mM, respectively). Citrulline, the intermediate following ornithine in the pathway, caused < 15 % inhibition at 10 mM.

Using the DTNB-based and ArgB-linked ArgA assays described in Methods, the purified ArgJ did not synthesize NAG from L-glutamate and acetyl-CoA. This indicates that *S. meliloti* ArgJ is monofunctional and can only deacetylate NAO to form ornithine and NAG, and cannot synthesize NAG *de novo*. The ability of plasmid pBB5-argJ to complement the growth defect of the *E. coli* Δ argE::Km mutant, but not that of the Δ argA::Km mutant, supports this conclusion (data not shown).

Sequence analysis, purification and characterization of ArgE

The megaplasmid-encoded *S. meliloti* *argE* (SMA1836, 374 aa) encodes a predicted 39.7 kDa product with 28.5 % amino acid identity to the *E. coli* K-12 enzyme (383 aa). Both proteins conserve all active-site and metal-binding residues characteristic of the ArgE/DapE (diaminopimelate desuccinylase)/Cpg2 (carboxypeptidase G2) family signature (Prosite PS00758 and PS00759).

Because the purified 6His-Sumo-ArgE lost all activity following removal of the affinity tag, we were unable to characterize the tag-free enzyme. The specific activity of the purified 6His-Sumo-ArgE was 1200 ± 95 U (mean \pm SD for duplicate assays) and its apparent K_m for NAO was about 4 mM (results not shown). Metal ion removal from the purified Sumo-ArgE decreased its activity by nearly 90 % in reactions without added CoCl_2 in comparison with those containing

Table 3. Properties of the purified *S. meliloti* 1021 ArgJ (Sm; this work) and those of the ArgJs from *G. stearothermophilus* (Gs), *Thermotoga neapolitana* (Tn), *Methanococcus jannashii* (Mj) and *Streptomyces clavuligerus* (Sc)

Parameter	Organism				
	Sm	Gs*	Tn*	Mj*	Sc†
Subunit mol. mass (kDa)					
α	23.0	21.0–24.0	21.0–24.0	21.0–24.0	17.2
β	25.0	28.0–29.0	28.0–29.0	28.0–29.0	22.5
Holoenzyme mol. mass (kDa)	88.0‡	98.0	85.0	90.0	76.8 ± 3.5
V_{\max} (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹)	2154.0 ± 0.2	27 000.0	290 000.0	175 000.0	23.2
K_m NAO (mM)	2.10 ± 0.3	2.70	8.10	9.60	4.23
K_m L-glutamate (mM)	8.20 ± 0.7	19.20	27.90	11.30	17.32
I_{50} L-ornithine (mM)	2.40 ± 0.1	2.30	2.10	1.10	0.69
NAG synthase activity	No	Yes	Yes	No	No

*Marc *et al.* (2000).†de la Fuente *et al.* (2004).‡The molecular mass was determined on a 2.5 × 85 cm SEC400 gel column (Bio-Rad), previously calibrated with Bio-Rad Gel Filtration protein standard, in 50 mM Tris/HCl/50 mM NaCl (pH 7.0) at a flow rate of 1 ml min⁻¹ with eluate monitoring at 280 nm.

0.2 mM CoCl₂. MnCl₂ (0.2 mM) added to the reaction in place of CoCl₂ restored activity to about 40 % of that seen with CoCl₂, while ZnSO₄ was completely ineffective (results not shown). The purified ArgE from *E. coli* also has its highest activity in the presence of cobalt (Cunin *et al.*, 1986; Javid-Majd & Blanchard, 2000).

Despite our ability to overexpress 6His-Sumo-ArgE from plasmid pSumo-ArgE in the *E. coli* BL21(DE3) WT strain, insertion of the plasmid into the BL21(DE3) Δ argE mutant did not restore arginine protrophy. Similarly, introduction of *argE* and its promoter region cloned into pGEM3Z, in the same transcriptional orientation as the T7 promoter of the vector, did not allow growth of the mutant in minimal medium M9 with or without IPTG. The mutant complemented with either of these plasmids grew well in M9 containing 1 mM ornithine (results not shown). The failure to complement the growth defect of the mutant with these plasmids could have resulted from a lack of expression of *S. meliloti* *argE*, or a lack of *S. meliloti* ArgE functionality in *E. coli*.

Expression of *argB*, *argE* and *argJ* transcriptional gene fusions

Although the strain 1021 genome sequence lacks recognizable genes for the genetic regulation of arginine gene expression (Dunn, 2015), we thought it worth determining whether the transcription of the *arg* genes under study was affected by exogenous ornithine or arginine. To do this, strain 1021 containing the *gusA* fusion plasmids was grown in MMS without or with these amino acids and Gus activity was determined (Table 4). When the SEM is taken into account, no significant alteration in the transcription of any of the *arg* genes by the exogenous amino acids was found. In comparison with *argE*, the *argJ* fusion was expressed at a higher level, consistent with, though not proportional to,

the higher ArgJ activity present in extracts. *argB* was transcribed at an intermediate level in comparison with *argE* and *argJ*. From these results, and the relatively unchanged specific activities of ArgB, ArgE and ArgJ in extracts prepared from cells grown with exogenous arginine or ornithine, we conclude that none of the *arg* genes are transcriptionally regulated by these amino acids.

DISCUSSION

A question posed by the presence of both ArgE and ArgJ in *S. meliloti* 1021 was whether the regulation of its arginine pathway more closely resembled a linear or acetyl group recycling pathway. The inhibition of ArgB by arginine is consistent with a recycling pathway and appears to be a key biochemical control point. The arginine auxotrophy of the *argB* mutant shows that alternative activities for NAG phosphorylation are absent or non-functional under the conditions tested.

A second question that we addressed was whether both ArgE and ArgJ were functional in producing ornithine from NAO. Based on the NAO deacetylating-specific activities in the WT and *arg* mutant extracts, the characteristics of the purified ArgJ and 6His-Sumo-ArgE and the higher transcriptional expression of *argJ*, we conclude that ArgJ contributes the major share of NAO deacetylating activity in *S. meliloti*. Demonstrating its absolute requirement in arginine synthesis is complicated by the presence of Ama activity that is able to fully compensate for the absence of both ArgE and ArgJ.

In bacteria, how commonly do both ArgE and ArgJ occur in the same organism? To estimate this, we used the *S. meliloti* ArgE and ArgJ sequences to search for orthologues in the KEGG database (<http://www.kegg.jp/dbget/>).

Table 4. β -Glucuronidase (Gus) activities produced by *S. meliloti* 1021 containing *arg* gene transcriptional fusion plasmids

Amino acid in medium†	Plasmid and Gus Specific activity (U)*		
	pBB53- <i>argB</i> :: <i>gusA</i>	pBB53- <i>argE</i> :: <i>gusA</i>	pBB53- <i>argJ</i> :: <i>gusA</i>
None	8.7 \pm 5.9	5.9 \pm 3.1	18.0 \pm 3.7
L-Arginine	10.4 \pm 8.0	3.8 \pm 3.0	13.4 \pm 4.4
L-Ornithine	7.1 \pm 4.3	4.2 \pm 3.7	17.2 \pm 1.8

*Values are the mean \pm SD for at least two independent experiments.

†Cultures were grown in MMS medium with or without 1 mM of the amino acid indicated.

The results were manually curated to eliminate multiple strains sequenced within the same species or subspecies and to ensure that the returned genes were at least 30 % identical to the *S. meliloti* query sequences. By this analysis, we found 372 unique bacterial species potentially encoding both ArgE and ArgJ. This represents 14.7 % of the 2518 unique bacterial species that have been completely sequenced (Land *et al.*, 2015). The same analysis performed with the *S. meliloti* HipO1 sequence as a query revealed that a HipO1 orthologue was present in 75.8 % of the unique species containing both ArgE and ArgJ.

Based on the relatively high enzymic activities of the purified enzymes, we propose that the *S. meliloti* HipO1, HipO2 and SMB21279 are responsible for Ama activity and that their collective inactivation in the *argEJ* mutant might be necessary to activate arginine auxotrophy. The ability of *hipO1* and *hipO2*, but not *smB21279*, to complement the *E. coli* Δ *argE*::Km mutant further supports the functionality of at least the two former gene products. Genetic redundancies are common in *S. meliloti* and may be evolutionarily conserved because: (i) the combined activities of their products allow a net increase in the production of a metabolite; (ii) their products only partially overlap in their substrate specificities; or (iii) the genes or protein products are differentially regulated (diCenzo & Finan, 2015). In *P. aeruginosa* PAO1, which encodes both *argE* and *argJ*, the arginine prototrophy of mutants inactivated in either gene was presumed to be due to genetic redundancy (Jacobs *et al.*, 2003). However, strain PAO1 also encodes a putative HipO (UniProt accession no. N297_3025) with 47–53 % deduced amino acid identity to the three *S. meliloti* HipOs.

We hypothesize that ArgJ is the ‘housekeeping’ enzyme for arginine biosynthesis in *S. meliloti* and that the megaplasmid-encoded ArgE functions in producing additional ornithine under specific conditions. The *argE* gene is preceded by a potential Pho-box but its expression does not change in response to medium phosphate concentration or *phoB* inactivation (Yuan *et al.*, 2006). Hippurate hydrolases have been enzymically characterized in a number of bacteria but their physiological role remains undefined (Steele *et al.*, 2006). Broad-specificity aminoacylases that deacetylate

NAO have been shown to function either in addition to, or in place of, ArgE or ArgJ in *Bacillus* spp. and *C. jejuni* (Cho *et al.*, 1987; Hani *et al.*, 1999; Sakanyan *et al.*, 1993a). Genes encoding products with high similarity to the *S. meliloti* hippurate hydrolases occur in other rhizobia. The genomes of *Sinorhizobium* sp. NGR234, *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae 3841, *Rhizobium etli* CFN42 and *Mesorhizobium loti* MAFF303099 encode proteins with 71–94 % amino acid identity to the *S. meliloti* HipO1. These species also encode proteins with 51–91 % amino acid identity to the *S. meliloti* HipO2. Proteins with about 85 % amino acid identity to SM_b21279 occur in *R. leguminosarum* bv. viciae 3841 and *R. etli* CFN42. Whether these enzymes in *S. meliloti* and other rhizobia evolved to participate in ornithine production or have distinct metabolic functions is not known.

The *S. meliloti* ArgJ is a monofunctional enzyme regulated at the biochemical, but not transcriptional, level by ornithine and so provides a second point of biochemical regulation of the pathway. The monofunctionality of the ArgJ necessitates that *S. meliloti* contain one or more enzymes with NAG synthase activity. We are currently working to identify these enzyme(s).

We failed to detect any apparent transcriptional regulation of the genes encoding *argB*, *argE* or *argJ*. The potential for genetic regulation of the *S. meliloti* arginine pathway thus remains an open question, although decreased expression of *arg* genes (and *hipO1*) in bacteroids versus cultured cells has been reported (Barnett *et al.*, 2004). To address their importance *in planta*, we are determining the symbiotic phenotypes of the 1021 *argE*, *argJ* and *argEJ* mutants on alfalfa, along with the construction of *hipO1* and *hipO2* mutants for this purpose. We hope that the results obtained will help to clarify whether ArgE, and perhaps one or more of the HipO orthologues, have condition-specific roles in arginine biosynthesis, or in producing the additional ornithine needed for the biosynthesis of compounds like polyamines.

ACKNOWLEDGEMENTS

Partial financial support for this work was provided by grants from DGAPA-UNAM (IN212008 and IN208811) to M. F. D. We thank

Dr Jaime Mora for useful discussions, P. Gaitán and E. López (IBT-UNAM) for oligonucleotide synthesis, and Angélica Cruz, Eunice López and Edgardo Madrid Paulino for technical assistance.

REFERENCES

- Arteaga, A. & Dunn, M. (2015). Physiological roles of polyamines in rhizobia. *Insights Biotechnol.* (in press).
- Baetens, M., Legrain, C., Boyen, A. & Glansdorff, N. (1998). Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in the extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB27. *Microbiology* **144**, 479–492.
- Barnett, M. J., Fisher, R. F., Jones, T., Komp, C., Abola, A. P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F. & other authors (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium melloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9883–9888.
- Barnett, M. J., Toman, C. J., Fisher, R. F. & Long, S. R. (2004). A dual-genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16636–16641.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Boutry, M. & other authors (2001). Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium melloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9877–9882.
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**, 541–555.
- Cho, H.-Y., Tanizawa, K., Tanaka, H. & Soda, K. (1987). Thermostable aminoacylase from *Bacillus thermoglucosidius*: purification and characterization. *Agric Biol Chem* **51**, 2793–2800.
- Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. & Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* **50**, 314–352.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640–6645.
- de la Fuente, A., Martín, J. F., Rodríguez-García, A. & Liras, P. (2004). Two proteins with ornithine acetyltransferase activity show different functions in *Streptomyces clavuligerus*: Oat2 modulates clavulanic acid biosynthesis in response to arginine. *J Bacteriol* **186**, 6501–6507.
- Díaz, R., Vargas-Lagunas, C., Villalobos, M. A., Peralta, H., Mora, Y., Encarnación, S., Girard, L. & Mora, J. (2011). *argC* Orthologs from Rhizobiales show diverse profiles of transcriptional efficiency and functionality in *Sinorhizobium melloti*. *J Bacteriol* **193**, 460–472.
- diCenzo, G. C. & Finan, T. M. (2015). Genetic redundancy is prevalent within the 6.7 Mb *Sinorhizobium melloti* genome. *Mol Genet Genomics*. (in press).
- Dunn, M. F. (2015). Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Crit Rev Microbiol.* (in press).
- Dunn, M. F., Araiza, G. & Finan, T. M. (2001). Cloning and characterization of the pyruvate carboxylase from *Sinorhizobium melloti* Rm1021. *Arch Microbiol* **176**, 355–363.
- Dunn, M. F., Díaz, R. & Hernández-Lucas, I. (2008). Características regulatorias de la N-acetilglutamato cinasa (ArgB) de *Sinorhizobium melloti* Rm1021. In *VIII Congreso Nacional de la Fijación Biológica del Nitrógeno*, pp. 69–70.
- Fellay, R., Frey, J. & Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene* **52**, 147–154.
- Fernández-Murga, M. L., Gil-Ortiz, F., Llácer, J. L. & Rubio, V. (2004). Arginine biosynthesis in *Thermotoga maritima*: characterization of the arginine-sensitive N-acetyl-L-glutamate kinase. *J Bacteriol* **186**, 6142–6149.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1648–1652.
- Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M. & Romero, D. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1283–1292.
- Haas, D. & Leisinger, T. (1975a). N-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. Purification and ligand-directed association-dissociation. *Eur J Biochem* **52**, 365–375.
- Haas, D. & Leisinger, T. (1975b). N-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. Catalytic and regulatory properties. *Eur J Biochem* **52**, 377–393.
- Hani, E. K., Ng, D. & Chan, V.-L. (1999). Arginine biosynthesis in *Campylobacter jejuni* TGH9011: determination of the *argCOBD* cluster. *Can J Microbiol* **45**, 959–969.
- Jacobs, M. A., Alwood, A., Thaipisuttikul, I., Spencer, D., Haugen, E., Ernst, S., Will, O., Kaul, R., Raymond, C. & other authors (2003). Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 14339–14344.
- Javid-Majid, F. & Blanchard, J. S. (2000). Mechanistic analysis of the *argE*-encoded N-acetylornithine deacetylase. *Biochemistry* **39**, 1285–1293.
- Kershaw, N. J., McNaughton, H. J., Hewitson, K. S., Hernández, H., Griffin, J., Hughes, C., Greaves, P., Barton, B., Robinson, C. V. & Schofield, C. J. (2002). ORF6 from the clavulanic acid gene cluster of *Streptomyces clavuligerus* has ornithine acetyltransferase activity. *Eur J Biochem* **269**, 2052–2059.
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M. II & Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**, 175–176.
- Land, M., Hauser, L., Jun, S.-R., Nookaew, I., Leuze, M. R., Ahn, T.-H., Karpinets, T., Lund, O., Kora, G. & other authors (2015). Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Funct Integr Genomics* **15**, 141–161.
- Lohmeier-Vogel, E. M., Loukanina, N., Ferrar, T. S., Moorhead, G. B. G. & Thorpe, T. A. (2005). N-acetyl glutamate kinase from *Daucus carota* suspension cultures: embryogenic expression profile, purification and characterization. *Plant Physiol Biochem* **43**, 854–861.
- López-Lara, I. M., Gao, J.-L., Soto, M. J., Solares-Pérez, A., Weissenmayer, B., Sohlenkamp, C., Verroios, G. P., Thomas-Oates, J. & Geiger, O. (2005). Phosphorus-free membrane lipids of *Sinorhizobium melloti* are not required for the symbiosis with alfalfa but contribute to increased cell yields under phosphorus-limiting conditions of growth. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 973–982.
- Madrid, E. (2013). *Búsqueda del gen que codifica para la enzima N-acetilglutamato sintasa por mutagénesis*, PhD thesis, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Marc, F., Weigel, P., Legrain, C., Almeras, Y., Santrot, M., Glansdorff, N. & Sakanyan, V. (2000). Characterization and kinetic mechanism of mono- and bifunctional ornithine acetyltransferases from thermophilic microorganisms. *Eur J Biochem* **267**, 5217–5226.

- Martínez-Salazar, J. M. & Romero, D. (2000).** Role of the *ruvB* gene in homologous and homeologous recombination in *Rhizobium etli*. *Gene* **243**, 125–131.
- Meade, H. M., Long, S. R., Ruvkun, G. B., Brown, S. E. & Ausubel, F. M. (1982).** Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* **149**, 114–122.
- Omelchenko, M. V., Galperin, M. Y., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2010).** Non-homologous isofunctional enzymes: a systematic analysis of alternative solutions in enzyme evolution. *Biol Direct* **5**, 31.
- Prentki, P. & Krisch, H. M. (1984).** In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**, 303–313.
- Quandt, J. & Hynes, M. F. (1993).** Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**, 15–21.
- Sakanyan, V., Kochikyan, A., Mett, I., Legrain, C., Charlier, D., Piérard, A. & Glansdorff, N. (1992).** A re-examination of the pathway for ornithine biosynthesis in a thermophilic and two mesophilic *Bacillus* species. *J Gen Microbiol* **138**, 125–130.
- Sakanyan, V., Charlier, D., Legrain, C., Kochikyan, A., Mett, I., Piérard, A. & Glansdorff, N. (1993a).** Primary structure, partial purification and regulation of key enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Bacillus stearothermophilus*: dual function of ornithine acetyltransferase. *J Gen Microbiol* **139**, 393–402.
- Sakanyan, V., Desmarez, L., Legrain, C., Charlier, D., Mett, I., Kochikyan, A., Savchenko, A., Boyen, A., Falmagne, P. & other authors (1993b).** Gene cloning, sequence analysis, purification, and characterization of a thermostable aminoacylase from *Bacillus stearothermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3878–3888.
- Sakanyan, V., Petrosyan, P., Lecocq, M., Boyen, A., Legrain, C., Demarez, M., Hallet, J. N. & Glansdorff, N. (1996).** Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. *Microbiology* **142**, 99–108.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. & Pühler, A. (1994).** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69–73.
- Shaw, F. L. (2011).** *From prediction to function: Polyamine biosynthesis and formate metabolism in the α - and ϵ - proteobacteria*, PhD thesis, University of East Anglia, UK.
- Shaw, F. L., Elliott, K. A., Kinch, L. N., Fuell, C., Phillips, M. A. & Michael, A. J. (2010).** Evolution and multifarious horizontal transfer of an alternative biosynthetic pathway for the alternative polyamine sym-homospermidine. *J Biol Chem* **285**, 14711–14723.
- Soto, M. J., Zorzano, A., García-Rodríguez, F. M., Mercado-Blanco, J., López-Lara, I. M., Olivares, J. & Toro, N. (1994a).** Identification of a novel *Rhizobium meliloti* nodulation efficiency *nfe* gene homolog of *Agrobacterium ornithine* cyclodeaminase. *Mol Plant Microbe Interact* **7**, 703–707.
- Soto, M. J., van Dillewijn, P., Olivares, J. & Toro, N. (1994b).** Ornithine cyclodeaminase activity in *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol Lett* **119**, 209–214.
- Steele, M., Marccone, M., Gyles, C., Chan, V. L. & Odumeru, J. (2006).** Enzymatic activity of *Campylobacter jejuni* hippurate hydrolase. *Protein Eng Des Sel* **19**, 17–25.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J. & other authors (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959–964.
- Tanimoto, K., Higashi, N., Nishioka, M., Ishikawa, K. & Taya, M. (2008).** Characterization of thermostable aminoacylase from hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*. *FEBS J* **275**, 1140–1149.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673–4680.
- Vogel, H. J. & Bonner, D. M. (1956).** Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* **218**, 97–106.
- Xu, M., Rao, Z., Dou, W., Yang, J., Jin, J. & Xu, Z. (2012).** Site-directed mutagenesis and feedback-resistant *N*-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. *Amino Acids* **43**, 255–266.
- Xu, Y., Labedan, B. & Glansdorff, N. (2007).** Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 36–47.
- Yakobson, E. A. & Guiney, D. G. Jr (1984).** Conjugal transfer of bacterial chromosomes mediated by the RK2 plasmid transfer origin cloned into transposon Tn5. *J Bacteriol* **160**, 451–453.
- Yuan, Z. C., Zaheer, R., Morton, R. & Finan, T. M. (2006).** Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic Acids Res* **34**, 2686–2697.
- Zamorano-Sánchez, D., Reyes-González, A., Gómez-Hernández, N., Rivero, P., Georgellis, D. & Girard, L. (2012).** FxkR provides the missing link in the *fixL*-*fixK* signal transduction cascade in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol Plant Microbe Interact* **25**, 1506–1517.

Edited by: G. Thomas

10. LITERATURA CITADA

- Abadjieva A, Pauwels K, Hilven P and Crabeel M. 2001. A new yeast metabolon involving at least the two first enzymes of arginine biosynthesis: acetylglutamate synthase activity requires complex formation with acetylglutamate kinase. *J Biol Chem* 276:4 2869-80.
- Abraham T, Prenner EJ, Lewis RN, Mant CT, Keller S, Hodges RS and McElhaney RN. 2014. Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide gramicidin S and its analogs: Aqueous solubility, self-association, conformation, antimicrobial activity and interaction with model lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 1838: 1420-1429.
- Alcázar R, Altabella T, Marco F, Bortolotti C, Reymond M, Koncz C, Carrasco P and Tiburcio AF. 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 2316: 1237-1249.
- Alfano P, Fani R, Lio P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS, Bruni CB. 1996. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev* 60: 44-69.
- Ames BN, Garry B, Herzenberg LA. 1960. The genetic control of the enzymes of histidine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol* 22: 369-378.
- Ames BN, Hartman PE, Jacob F. 1963. Chromosomal alterations affecting the regulation of histidine biosynthetic enzymes in *Salmonella*. *J Mol Biol* 7: 23-42.
- Anton DN. 1968. Histidine regulatory mutants in *Salmonella typhimurium*. V. Two new classes of histidine regulatory mutants. *J Mol Biol* 33: 533-546.
- Azevedo V, Sorokin A, Ehrlich SD and Serror P. 1993. The transcriptional organization of the *Bacillus subtilis* 168 chromosome region between the *spoVAF* and *serA* genetic loci. *Mol Microbiol* 10:397-405.
- Baetens M, Legrain C, Boyen A and Glansdorff N. 1998. Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in the extreme thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*. *Microbiology* 144: 479-492.
- Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, Komp C, Abola AP, Barloy-Hubler F, Bowser L, Capela D, Galibert F, Gouzy J, Gurjal M, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Palm C, Peck MC, Surzycki R, Wells DH, Yeh KC, Davis RW, Federspiel NA and Long SR. 2001. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci. USA* 98: 9883-9888.
- Bordogna A, Pandini A and L Bonati. 2011. Predicting the accuracy of protein-ligand docking on homology models. *J Comput Chem* 32: 81-98.
- Bosello M, Robbel L, Linne U, Xie X and Marahiel MA. 2011. Biosynthesis of the siderophore rhodochelin requires the coordinated expression of three independent gene clusters in *Rhodococcus jostii* RHA1. *J Am Chem Soc* 133: 4587-4595.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54.
- Brown AG, Butterworth D, Cole M, Hanscomb G, Hood JD, Reading C and Rolinson GN. 1976. Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiotics* 29: 668-669.
- Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Puhler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thebault P, Vandenbol M, Weidner S and Galibert F. 2001. Analysis of the chromosome sequence

- of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. Proc Natl Acad Sci USA 98: 9877-9882.
- Challis GL and Ravel J. 2000. Coelichelin, a new peptide siderophore encoded by the *Streptomyces coelicolor* genome: structure prediction from the sequence of its non-ribosomal peptide synthetase. FEMS Microbiol Lett 187: 111-114.
- Chambers I, Frampton J, Goldfarb P, Affara N, McBain W, Harrison PR .1986. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. The EMBO J 5: 1221-1227.
- Charlier D, Crabeel M, Palchaudhuri S, Cunin, Boyen A, Glansdorff N. 1978. Heteroduplex analysis of regulatory mutations and of insertions (IS1, IS2, IS5) in the bipolar *argECBH* operon of *Escherichia coli*. Mol Gen Genet 161: 175-184.
- Charlier D, Roovers M, Van Vliet F, Boyen A, Cunin R, Nakamura Y, Glansdorff N and Piérard A. 1992. Arginine regulon of *Escherichia coli* K-12. A study of repressor-operator interactions and of *in vitro* binding affinities versus *in vivo* repression. J Mol Biol 226: 367-86.
- Cheng H and Grishin NV. 2005. DOM-fold: A structure with crossing loops found in DmpA, ornithine acetyltransferase, and molybdenum cofactor-binding domain. Protein Sci 14: 1902-1910.
- Chen IF, Wu HJ, Chen CY, Chou KM and Chang CK. 2016. Branched-chain amino acids, arginine, citrulline alleviate central fatigue after 3 simulated matches in taekwondo athletes: a randomized controlled trial. J Int Soc Sports Nutr 13: 13-28.
- Cherney LT, Cherney MM, Garen CR and James MN. 2009. The structure of the arginine repressor from *Mycobacterium tuberculosis* bound with its DNA operator and Corepressor, L-arginine. J Mol Biol 388: 85-97.
- Cherney LT, Cherney MM, Garen CR and James MN. 2010. Crystal structure of the intermediate complex of the arginine repressor from *Mycobacterium tuberculosis* bound with its DNA operator reveals detailed mechanism of arginine repression. J Mol Biol 399: 240-54.
- Cho BK, Federowicz S, Park YS, Zengler K, Palsson BØ. 2011. Deciphering the transcriptional regulatory logic of amino acid metabolism. Nat Chem Biol 8:65-71.
- Cozzone AJ .2010. Proteins: Fundamental Chemical Properties. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Cunin R, Glansdorff N, Piérard A and Stalon V. 1986. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. Microbiol Rev 50: 314-352.
- Czaplewski LG, North AK, Smith MC, Baumberg S and Stockley PG. 1992. Purification and initial characterization of AhrC: the regulator of arginine metabolism genes in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 6: 267-75.
- de la Fuente A, Martín JF, Rodríguez-García A and Liras P. 2004. Two proteins with ornithine acetyltransferase activity show different functions in *Streptomyces clavuligerus*: Oat2 modulates clavulanic acid biosynthesis in response to arginine. J Bacteriol 186: 6501-7.
- de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U and Timmis KN. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. J Bacteriol 172: 6568-6572.
- Deckert G, Warren PV, Gaasterland T, Young WG, Lenox AL, Graham DE, Overbeek R, Snead MA, Keller M, Aujay M, Huber R, Feldman RA, Short JM, Olsen GJ and Swanson RV.

1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392: 353-8.
- Deferrari G, Mannucci I and Garibotto G. 2010. Amino Acid Biosynthesis. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Dennis CC, Glykos NM, Parsons MR and Phillips SE. 2002. The structure of AhrC, the arginine repressor/activator protein from *Bacillus subtilis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58: 421-30.
- Di Martino ML, Campilongo R, Casalino M, Micheli G, Colonna B and Prosseda G. 2013. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. *Int J Med Microbiol* 303: 484-491.
- Díaz R, Vargas-Lagunas C, Villalobos MA, Peralta H, Mora Y, Encarnación S, Girard L and Mora J. 2011. *argC* orthologs from Rhizobiales show diverse profiles of transcriptional efficiency and functionality in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 193: 460-72.
- diCenzo GC and Finan TM. 2015. Genetic redundancy is prevalent within the 6.7 Mb *Sinorhizobium meliloti* genome. *Mol Genet Genomics* 290: 1345-1356.
- Dimise EJ, Widboom PF and Bruner SD. 2008. Structure elucidation and biosynthesis of fuscachelins, peptide siderophores from the moderate thermophile *Thermobifida fusca*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15311-15316.
- Dimova D, Weigel P, Takahashi M, Marc F, Van Duyne GD, Sakanyan V. 2000. Thermostability, oligomerization and DNA-binding properties of the regulatory protein ArgR from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana*. *Mol Gen Genet* 263: 119-30.
- Dion M, Charlier D, Wang H, Gigot D, Savchenko A, Hallet JN, Glansdorff N and Sakanyan V. 1997. The highly thermostable arginine repressor of *Bacillus stearothermophilus*: gene cloning and repressor-operator interactions. *Mol Microbiol* 25: 385-98.
- Dunn MF. 2015. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Crit Rev Microbiol* 4: 411-451.
- Dunn M.F., Díaz R., Hernández-Lucas I.. 2008; Características regulatorias de la N-acetilglutamato cinasa (ArgB) de *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. In VIII Congreso Nacional de la Fijación Biológica del Nitrógeno pp.69-70.
- Eckhardt T, Leisinger T. 1975. Isolation and characterization of mutants with a feedback resistant N-acetylglutamate synthase in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 138: 225-32.
- Elkins JM, Kershaw NJ and Schofield CJ. 2005. X-ray crystal structure of ornithine acetyltransferase from the clavulanic acid biosynthesis gene cluster. *Biochem J* 385: 565-73.
- Errey JC and Blanchard JS. 2005. Functional Characterization of a Novel ArgA from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 177: 3039-3044.
- Fernández-Murga ML and Rubio V. 2008. Basis of arginine sensitivity of microbial N-acetyl-L-glutamate Kinases: mutagenesis and protein engineering study with the *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* enzymes. *J Bacteriol* 190: 3018-3025.
- Fernández-Murga ML, Gil-Ortiz F, Llácer JL and Rubio V. 2004. Arginine biosynthesis in *Thermotoga maritima*: characterization of the arginine-sensitive N-acetyl-L-glutamate kinase. *J Bacteriol* 185: 6142-6149.
- Ferraioli S, Tate R, Caputo E, Lamberti A, Riccio A and Patriarca EJ. 2001. The *Rhizobium etli argC* gene is essential for arginine biosynthesis and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* 14: 250-254.

- Fink GR, Klopotoski T, Ames BN. 1967. Histidine regulatory mutants in *Salmonella typhimurium*. IV. A positive selection for polar histidine requiring mutants from histidine operator constitutive mutants. *J Mol Biol* 30: 81-95.
- Finan TM, Weidner S, Wong K, Buhrmester J, Chain P, Vorholter FJ, Hernandez-Lucas I, Becker A, Cowie A, Gouzy J, Golding B, Puhler A. 2001. The complete sequence of the 1.683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9889-9894.
- Friedrich B and Magasanik B. 1978. Utilization of arginine by *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol* 133: 680-685.
- Friedrich B, Friedrich CG and Magasanik B. 1978. Catabolic N²-acetylornithine-5 aminotransferase of *Klebsiella aerogenes*: control of synthesis by induction, catabolite repression, and activation by glutamine synthase. *J Bacteriol* 133: 686-691.
- Füser G and Steinbüchel A. 2007. Analysis of genome sequences for genes of cyanophycin metabolism: identifying putative cyanophycin metabolizing prokaryotes. *Macromol Biosci* 7: 278-296.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC, Batut J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.
- Gao JL, Weissenmayer B, Taylor AM, Thomas-Oates J, López-Lara IM and Geiger O. 2004. Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Mol Microbiol* 53:1757-70.
- Gardan R, Rapoport G and Debarbouille M. 1995. Expression of the *rocDEF* operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 249: 843-856.
- Garnett JA, Marincs F, Baumberg S, Stockley PG and Phillips SE. 2008. Structure and function of the arginine repressor-operator complex from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 379: 284-298.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD and Bairoch A. 2003. ExpASY: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res.* 31: 3784-8.
- Geiger O, Röhrs V, Weissenmayer B, Finan TM and Thomas-Oates JE. 1999. The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol Microbiol* 32: 63-73.
- Ghochikyan A, Karaivanova IM, Lecocq M, Vusio P, Arnaud MC, Snapyan M, Weigel P, Guével L, Buckle M and Sakanyan V. 2002. Arginine operator binding by heterologous and chimeric ArgR repressors from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* 184: 6602-6614.
- Gibbons HS, Lin S, Cotter RJ and Raetz CR. 2000. Oxygen requirement for the biosynthesis of the S-2-hydroxy- myristate moiety in *Salmonella typhimurium* lipid A. Function of LpxO, A new Fe²⁺/alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homologue. *J Biol Chem* 275: 32940–32949.

- Gil-Ortiz F, Ramón-Maiques S, Fernández-Murga ML, Fita I and Rubio V. 2010. Two crystal structures of *Escherichia coli* N-acetyl-L-glutamate kinase demonstrate the cycling between open and closed conformations. *J Mol Biol* 399: 476-90.
- Goryshin IY, Miller JA, Kil YV, Lanzov VA and Reznikoff WS. 1998. Tn5/IS50 target recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 10716-21.
- Green B, Bouchier C, Fairhead C, Craig NL and Cormack BP. 2012. Insertion site preference of Mu, Tn5, and Tn7 transposons. *Mob DNA*. 3: 3.
- Guerrero G, Peralta H, Aguilar A, Díaz R, Villalobos MA, Medrano-Soto A and Mora J. 2005. Evolutionary, structural and functional relationships revealed by comparative analysis of syntenic genes in Rhizobiales. *BMC Evol Biol* 5: 55.
- Haas D and Leisinger T. 1975. N-acetylglutamate 5-phosphotransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. Catalytic and regulatory properties. *Eur J Biochem* 52: 377-383.
- Haas D, Kurer V and Leisinger T. 1972. N-acetylglutamate synthetase of *Pseudomonas aeruginosa*. An assay *in vitro* and feedback inhibition by arginine. *Eur J Biochem* 31: 290-295.
- Haas D, Holloway BW and Schamböck A. 1977. The genetic organization of arginine biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 154: 7-22.
- Haas H, Eisendle M and Turgeon BG. 2008. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* 46: 149-187.
- Hani EK, Ng D and Chan VL. 1999. Arginine biosynthesis in *Campylobacter jejuni* TGH9011: determination of the argCOBD cluster. *Can J Microbiol* 45: 959-969.
- Hao B, Gong W, Ferguson TK, James CM, Krzycki JA, Chan MK. 2002. A new UAG-encoded residue in the structure of a methanogen methyltransferase. *Science* 296: 1462-1466.
- Hartman PE. 1956. Linked *loci* in the control of consecutive steps in the primary pathway of histidine synthesis in *Salmonella typhimurium*. *Carnegie Inst Wash Publ* 612: 35-62.
- Herrero M, de Lorenzo V and Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172: 6557-6567.
- Herron PR, Hughes G, Chandra G, Fielding S and Dyson PJ. 2004. Transposon Express, a software application to report the identity of insertions obtained by comprehensive transposon mutagenesis of sequenced genomes: analysis of the preference for *in vitro* Tn5 transposition into GC-rich DNA. *Nucleic Acids Res*. 32: e113.
- Higgins CE and Kastner RE. 1971. *Streptomyces clavuligerus* sp. nov., a b-lactam antibiotic producer. *Int J Syst Evol Microbiol* 21: 326-331.
- Hindle Z, Callis R, Dowden S, Rudd BA and Baumberg S. 1994. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a *Streptomyces coelicolor* A3(2)*argCJB* gene cluster. *Microbiology* 140: 311-320.
- Hirasawa T and Shimizu H. 2016. Recent advances in amino acid production by microbial cells. *Curr Opin Biotechnol* 42: 133-146.
- Holtham CA, Jumel K, Miller CM, Harding SE, Baumberg S and Stockley PG. 1999. Probing activation of the prokaryotic arginine transcriptional regulator using chimeric proteins. *J Mol Biol* 289: 707-727.
- Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenther D, Bovee D, Olson MV and Manoel C. 2003.

- Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100: 14339-44.
- Javid-Majd F and Blanchard JS. 2000. Mechanistic analysis of the *argE*-encoded N-acetylornithine deacetylase. Biochemistry 39: 1285-1293.
- Jastrzębowska K and Gabriel I. 2015. Inhibitors of amino acids biosynthesis as antifungal agents. Amino Acids 47: 227-49.
- Jensen SE and Paradkar AS. 1999. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. Antonie Leeuwenhoek 75: 125-133.
- Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M and Tabata S. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res 3: 109-36.
- Khaleeli N, Li R and Townsend CA . 1999. Origin of the β -lactam carbons in clavulanic acid from an unusual thiamine pyrophosphate-mediated reaction. J Am Chem Soc 121: 9223-9224.
- Kodani S, Bicz J, Song L, Deeth RJ, Ohnishi-Kameyama M, Yoshida M, Ochi K and Challis GL. 2013. Structure and biosynthesis of scabichelin, a novel tris-hydroxamate siderophore produced by the plant pathogen *Streptomyces scabies* 87.22. Org Biomol Chem 11: 4686-4694.
- Kodani S, Kayameya MO, Yoshida M and Ochi K. 2011. A new siderophore isolated from *Streptomyces* sp. TM-34 with potent inhibitory activity against angiotensin-converting enzyme. Eur J Org Chem 17: 3191-3196.
- Kodani S, Komaki H, Suzuki M, Hemmi H and Ohnishi-Kameyama M. 2015a. Isolation and structure determination of new siderophore albachelin from *Amycolatopsis alba*. Biomaterials 28: 381-389.
- Kerppola TK, Kahn ML. 1988a. Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. J. Gen Microbiol 134: 913-919.
- Kerppola TK, Kahn ML. 1988b. Genetic analysis of carbamoylphosphate synthesis in *Rhizobium meliloti* 104A14. J. Gen Microbiol 134: 921-929.
- Kershaw NJ, McNaughton HJ, Hewitson KS, Hernández H, Griffin J, Hughes C, Greaves P, Barton B, Robinson CV, Schofield CJ. 2002. ORF6 from the clavulanic acid gene cluster of *Streptomyces clavuligerus* has ornithine acetyltransferase activity. Eur J Biochem 269: 2052-2059.
- Kondejewski LH, Farmer SW, Wishart DS, Hancock REW and Hodges RS. 1996. Gramicidin S is active against both gram-positive and gram-negative bacteria. Int J Pept Protein Res. 47: 460-466.
- Konz D, Klens A, Schörgendorfer K and Marahiel MA. 1997. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. Chem Biol. 4: 927-937.
- Kopp F and Marahiel MA. 2007. Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. Nat Prod Rep 4: 735-49.
- Kwon D-H, Lu C-D, Nalthall DA, Brown TM, Houghton JE, Abdelal A. 1994. Structure and regulation of the *carAB* operon in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas stutzeri*. J Bacteriol 176: 2532-2542.

- Kumar A, Vij N and Randhawa GS. 2003. Isolation and symbiotic characterization of transposon *Tn5*-induced arginine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. Indian J Exp Biol 41: 1198-1204.
- Lal PB, Schneider BL, Vu K and Reitzer L. 2014. The redundant aminotransferases in lysine and arginine synthesis and the extent of aminotransferase redundancy in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 94: 843-56.
- Lautru S, Deeth RJ, Bailey LM and Challis GL. 2005. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. Nat Chem Biol 1: 265-269.
- Li K, Chen WH and Bruner SD. 2015. Structure and Mechanism of the Siderophore-Interacting Protein from the Fuscachelin Gene Cluster of *Thermobifida fusca*. Biochemistry 54: 3989-4000.
- Lim DB, Oppenheim JD, Eckhardt T, Maas WK. 1987. Nucleotide sequence of the *argR* gene of *Escherichia coli* K-12 and isolation of its product, the arginine repressor. Proc Natl Acad Sci USA 84: 6697-6701.
- Lu CD, Yang Z, Li W. 2004. Transcriptome analysis of the ArgR regulon in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 186: 3855-3861.
- Lu CD, Houghton JE and Abdelal AT. 1992. Characterization of the arginine repressor from *Salmonella typhimurium* and its interactions with the *carAB* operator. J Mol Biol 225: 11-24.
- Maas WK. 1994. The arginine repressor of *Escherichia coli*. Microbiol Rev 58: 631-640.
- Maas WK and Clark AJ. 1964. Studies on the mechanism of repression of arginine biosynthesis in *Escherichia coli*. II. Dominance of repressibility in diploids. J Mol Biol 8:365-370.
- Maas WK, Maas R, Wiame JM and Glansdorff N. 1964. Studies on the mechanism of repression of arginine biosynthesis in *Escherichia coli*. I. Dominance of repressibility in zygotes. J Mol Biol 8: 359-364.
- Maas WK, Novelli GD and Lipmann F. 1953. Acetylation of glutamic acid by extracts of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA. 39: 1004-1008.
- Maghnouj A, De Sousa Cabral TF, Stalon V and Vander Wauven C. 1998. The *arcABDC* gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor *argR*. J Bacteriol 180: 6468-6475.
- Maheswaran M, Ziegler K, Lockau W, Hagemann and Forchhammer K. 2006. PII-regulated arginine synthesis controls accumulation of cyanophycin in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. J Bacteriol 188: 2730-2734
- Marc F, Weigel P, Legrain C, Almeras Y, Santrot M, Glansdorff N and Sakanyan V. 2000. Characterization and kinetic mechanism of mono and bifunctional ornithine acetyltransferases from thermophilic microorganisms. Eur J Biochem 267: 5217-26.
- Marc F, Weigel P, Legrain C, Glansdorff N and Sakanyan V. 2001. An invariant threonine is involved in self-catalyzed cleavage of the precursor protein for ornithine acetyltransferase. J Biol Chem 276: 25404-25410.
- Marcos E, Crehuet R and Bahar I. 2010. On the Conservation of the slow conformational dynamics within the amino acid kinase family: NAGK the Paradigm. PLoS Comput Biol 6: e1000738.
- Martin P and Mulks MH. 1992. Sequence analysis and complementation studies of the *argJ* gene encoding ornithine acetyltransferase from *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol 174: 2694-2701.

- Marvil DK and Leisinger T. 1977. *N*-acetylglutamatesynthase of *Escherichia coli*. Purification, characterization, and molecular properties. *J. Biol Chem* 252: 3295-3303.
- McGregor WC, Gillner DM, Swierczek SI, Liu D and Holz RC. 2013. Identification of a histidine metal ligand in the *argE*-encoded *N*-Acetyl-L-ornithine deacetylase from *Escherichia coli*. *SpringerPlus* 2: 482.
- McGregor WC, Swierczek SI, Bennett B, Holz RC. 2005. *argE*-encoded *N*-acetyl-L-ornithine deacetylase from *Escherichia coli* contains a dinuclear metalloactive site. *J Am Chem Soc* 127: 14100-14107.
- Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE and Ausubel FM. 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149: 114-22.
- Meinzel T, Schmitz E, Mechulan Y and Blanquet S. 1992. Structural and biochemical characterization of the *Escherichia coli argE* gene Product. *J Bacteriol* 174: 2323-2331.
- Miller CM, Baumberg S and Stockley PG. 1997. Operator interactions by the *Bacillus subtilis* arginine repressor/activator, AhrC: novel positioning and DNA-mediated assembly of a transcriptional activator at catabolic sites. *Mol Microbiol* 26: 37-48.
- Miranda-Casoluengo R, Prescott JF, Vazquez-Boland JA, Meijer WG. 2008. The intracellular pathogen *Rhodococcus equi* produces a catecholate siderophore required for saprophytic growth. *J Bacteriol* 190: 1631-1637.
- Minasov GA, Shuvalova LA, Brunzelle JS, Collar FR and Anderson WF. 2005. Crystal structure of *Bacillus subtilis* YXEP Protein (APC1829), a dinuclear metal binding peptidase from M20 family. *Sin publicar*.
- Ming LJ and Epperson JD. 2002. Metal binding and structure-activity relationship of the metalloantibiotic peptide bacitracin. *J Inorg Biochem* 91: 46-58.
- Mishima E, Hosokawa A, Imaizumi-Anraku H, Saito K, Kawagu M and Saeki K. 2008. Requirement for *Mesorhizobium loti* ornithine transcarbamoylase for successful symbiosis with *Lotus japonicus* as revealed by an unexpected long-range genome deletion. *Plant Cell Physiol* 49: 301-313.
- Miyagawa E, Yano J, Hamakado T, Kido Y, Nishimoto K and Motoki Y. 1985. Crystallization and properties of *N*-ben-zoylglycine amidohydrolase from *Pseudomonas putida*. *Agric Biol Chem (Tokyo)* 49: 2881-2886.
- Morin A, Huysveld N, Braun F, Dimova D, Sakanyan V and Charlier D. 2003. Hyperthermophilic *Thermotoga* arginine repressor binding to full-length cognate and heterologous arginine operators and to half-site targets. *J Mol Biol* 332: 537-553.
- Morizono H, Cabrera-Luque J, Shi D, Gallegos R, Yamaguchi S, Yu X, Allewell NM, Malamy MH, Tuchman M. 2006. Acetylornithine transcarbamylase: A novel enzyme in arginine biosynthesis. *J Bacteriol* 188: 2974–2982.
- Mosyak L, Reshetnikova L, Goldgur Y, Delarue M and Safro MG. 1995. Structure of phenylalanyl-tRNA synthetase from *Thermus thermophilus*. *Nat Struct Biol* 2: 537-547.
- Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J Biol Chem* 270: 26723-26726.
- Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD, Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, White O, Salzberg SL, Smith HO, Venter JC and Fraser CM.

1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399: 323-9.
- Ni J, Sakanyan V, Charlier D, Glansdorff N and Van Duyne GD. 1999. Structure of the arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*. *Nat Struct Biol* 6: 427-432.
- Nishijyo T, Park SM, Lu CD, Itoh Y and Abdelal AT. 1998. Molecular characterization and regulation of an operon encoding a system for transport of arginine and ornithine and the ArgR regulatory protein in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180: 5559-5566.
- O'Reilly M and Devine KM. 1994. Sequence analysis of the citrulline biosynthetic operon *argC-F* from *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 140: 1023-1025.
- Ottow JCG. 1974. Detection of hippurate hydrolase among *Bacillus* species by thin layer chromatography and other methods. *J Appl Bacteriol* 37: 15-30.
- Park SM, Lu CD and Abdelal AT. 1997. Purification and characterization of an arginine regulatory protein, ArgR, from *Pseudomonas aeruginosa* and its interactions with the control regions for the *car*, *argF*, and *aru* operons. *J Bacteriol* 179: 5309-5317.
- Payne SH and Loomis WF. 2006. Retention and loss of Amino Acid biosynthetic pathways Based on analysis of whole-genome sequences. *Eukaryotic Cell* 5: 272-276.
- Pearson WR and Sierk ML. 2005. The limits of protein sequence comparison? *Curr Opin Struct Biol* 15: 254-60.
- Petri K, Walter F, Persicke M, Rückert C and Kalinowski J. 2013. A novel type of N-acetylglutamate synthase is involved in the first step of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*. *BMC Genomics* 14:713
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC and Ferrin TE 2004. "UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis". *J Comput Chem* 25: 1605-12.
- Picard FJ and Dillon JR. 1989. Cloning and organization of seven arginine biosynthesis genes from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 171: 1644-1651.
- Prenner EJ, Lewis RNAH, Kondejewski LH, Hodges RS and McElhaney RN. 2004. Biophysical studies of the interaction of the antimicrobial peptide gramicidin S with lipid bilayers and biological membranes. *Phys Can* 60: 121-129.
- Qu Q, Morizono H, Shi D, Tuchman M and Caldovic L. 2007. A novel bifunctional N-acetylglutamate synthase-kinase from *Xanthomonas campestris* that is closely related to mammalian N-acetylglutamate synthase. *BMC Biochemistry* 8:4.
- Sankaranarayanan R, Cherney MM, Garen C, Garen G, Niu C, Yuan M and James MN. 2010. The molecular structure of ornithine acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* bound to ornithine, a competitive Inhibitor. *J Mol Biol* 397: 979-90.
- Ramón-Maiques S, Marina A, Gil-Ortiz F, Fita I and Rubio V. 2002. Structure of acetylglutamate kinase, a key enzyme for arginine biosynthesis and a prototype for the amino acid kinase enzyme family, during catalysis. *Structure* 10: 329-342.
- Ramón-Maiques S, Fernandez-Murga ML, Gil-Ortiz F, Vagin A, Fita I and Rubio V. 2006. Structural bases of feed-back control of arginine biosynthesis, revealed by the structures of two hexameric N-acetylglutamate kinases, from *Thermotoga maritima* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* 356: 695-713.
- Randhawa GS and Hassani R. 2002. Role of rhizobial biosynthetic pathways of amino acids, nucleotide bases and vitamins in symbiosis. *Indian J Exp Biol* 40: 755-64.

- Robbel L, Helmetag V, Knappe TA and Marahiel. MA. 2011. Consecutive enzymatic modification of ornithine generates the hydroxamate moieties of the siderophore erythrochelin. *Biochemistry* 50: 6073-6080.
- Rodríguez-García A, De La Fuente A, Pérez-Redondo R, Martín JF, and Liras P. 2000. Characterization and expression of the arginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces clavuligerus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2: 543-550.
- Rodríguez-García A, Ludovice M, Martín JF and Liras P. 1997. Arginine boxes and the *argR* gene in *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. *Mol Microbio.* 25: 219-228.
- Saitou N and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-25.
- Sakanyan V, Charlier D, Legrain C, Kochikyan A, Mett I, Piérard A and Glansdorff N. 1993. Primary structure, partial purification and regulation of key enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Bacillus stearothermophilus*: dual function of ornithine acetyltransferase. *J Gen Microbiol* 139: 393-402.
- Sakanyan V, Kochikyan A, Mett I, Legrain C, Charlier D, Piérard A and Glansdorff N. 1992. A re-examination of the pathway for ornithine biosynthesis in a thermophilic and two mesophilic *Bacillus* species. *J Gen Microbiol* 138: 125-130.
- Sakanyan V, Petrosyan P, Lecocq M, Boyen A, Legrain C, Demarez M, Hallet JN and Glansdorff N. 1996. Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. *Microbiology (UK)* 142: 99-108.
- Sancho-Vaello E, Fernández-Murga ML, Rubio V. 2012. Functional dissection of N-acetylglutamate synthase (ArgA) of *Pseudomonas aeruginosa* and restoration of its ancestral N-acetylglutamate kinase activity. *J Bacteriol* 194: 2791-2801.
- Sancho-Vaello E, Fernandez-Murga ML and Rubio V. 2009. Mechanism of arginine regulation of acetylglutamate synthase, the first enzyme of arginine synthesis. *FEBS Lett* 583: 202-206.
- Saudek V, Wormald MR, Williams RJ, Boyd J, Stefani M and Ramponi G. 1989. Identification and description of beta-structure in horse muscle acylphosphatase by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Mol Biol* 207: 405-415.
- Schleifer KH and Kandler O. 1972. Peptidoglycan. Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. *Bacteriol Rev* 36: 407-477.
- Ser HL, Law JW, Chaiyakunapruk N, Jacob SA, Palanisamy UD, Chan KG, Goh BH and Lee LH. 2016. Fermentation Conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: A systematic review. *Front Microbiol* 7:522.
- Shi D, Allewell NM and Tuchman M. 2015. The N-Acetylglutamate synthase family: structures, function and mechanisms. *Int J Mol Sci.* 16: 13004-13022.
- Shi D, Caldovic L, Jin Z, Yu X, Qu Q, Roth L, Hiroki Morizono, Hathout Y, Allewell NM and Tuchman M. 2006. Expression, crystallization and preliminary crystallographic studies of a novel bifunctional N-acetylglutamate synthase/kinase from *Xanthomonas campestris* homologous to vertebrate N-acetylglutamate synthase. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications* 62: 1218-1222.
- Shi D, Li Y, Cabrera-Luque J, Jin Z, Yu X, Zhao G, Haskins N, Allewell NM and Tuchman M. 2011. A novel N-acetylglutamate synthase architecture revealed by the crystal structure of the bifunctional enzyme from *Maricaulis maris*. *PLoS ONE* 6: e28825.

- Shi D, Morizono H, Yu X, Roth L, Caldovic L, Allewell NM, Malamy MH and Tuchman M. 2005. Crystal structure of N-acetylornithine transcarbamylase from *Xanthomonas campestris*: A novel enzyme in a new arginine biosynthetic pathway found in several eubacteria. *J Biol Chem* 280: 14366-14369.
- Shi D, Sagar V, Jin Z, Yu X, Caldovic L, Morizono H, Allewell N. and Tuchman M. 2008. The crystal structure of N-acetyl-L-glutamate synthase from *Neisseria gonorrhoeae* provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. *J. Biol Chem* 283: 7176-7184.
- Shi D, Yu X, Cabrera-Luque J, Chen TY, Roth L, Morizono H, Allewell NM and Tuchman M. 2007. A single mutation in the active site swaps the substrate specificity of N-acetyl-L-ornithine transcarbamylase and N-succinyl-L-ornithine transcarbamylase. *Protein Sci* 16: 1689-1699.
- Sievers F and Higgins DG. 2014. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol* 1079:105-16
- Silbert DF, Fink GR and Ames BN. 1966. Histidine regulatory mutants in *Salmonella typhimurium*. III. A class of regulatory mutants deficient in tRNA for histidine. *J Mol Biol* 22: 335-347.
- Simon RD and Weathers P. 1976. Determination of the structure of the novel polypeptide containing aspartic acid and arginine which is found in cyanobacteria. *Biochim Biophys Acta* 420: 165-176.
- Sohlenkamp C, de Rudder KE, Rohrs V, Lopez-Lara IM and Geiger O. 2000. Cloning and characterization of the gene for phosphatidylcholine synthase. *J Biol Chem* 275: 18919-18925.
- Song JY, Jensen SE and Lee KJ. 2010. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. *Appl Microbiol Biotechnol* 88: 659-669.
- Song H, Wang H, Gigot D, Dimova D, Sakanyan V, Glansdorff N and Charlier D. 2002. Transcription regulation in thermophilic bacteria: high resolution contact probing of *Bacillus stearothermophilus* and *Thermotoga neapolitana* arginine repressor-operator interactions. *J Mol Biol* 315: 255-274.
- Srinivasan G, James CM and Krzycki JA . 2002. Pyrrolysine encoded by UAG in Archaea: charging of a UAG-decoding specialized tRNA. *Science* 296: 1459-1462.
- Steele M, Marcone M, Gyles C, Chan VL and Odumeru J. 2006. Enzymatic activity of *Campylobacter jejuni* hippurate hydrolase. *Protein Eng Des Sel* 19: 17-25.
- Sunnerhagen M, Nilges M, Otting G and Carey J. 1997. Solution structure of the DNA-binding domain and model for the complex of multifunctional hexameric arginine repressor with DNA. *Nat Struct Biol* 4: 819-826.
- Udaka S and Kinoshita S. 1958. Studies on L-ornithine fermentation. I. The biosynthetic pathway of L-ornithine in *Micrococcus glutamicus*. *J Gen Appl Microbiol* 4: 283-288.
- Udvardi M and Poole PS. 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annu Rev Plant Biol* 64: 781–805.
- Umbarger HE. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Ann Rev Biochem* 47: 533-606.
- Valdés-Santiago L and Ruiz-Herrera J. 2014. Stress and polyamine metabolism in fungi. *Front Chem* 1:42
- Valentine BP, Bailey CR, Doherty A, Morris J, Elson SW, Baggaley KH and Nicholson NH. 1993. Evidence that arginine is later metabolic intermediate than ornithine in the

- biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. J Chem Soc Chem Commun 1210-1211.
- Van De Casteele M, Demarez M, Legrain C, Glansdorff N and Piérard A. 1990. Pathways of arginine biosynthesis in extreme thermophilic archaeo- and eubacteria. J Gen Microbiol 136: 1177-1183.
- Van Duyne GD, Ghosh G, Maas WK and Sigler PB. 1996. Structure of the oligomerization and L-arginine binding domain of the arginine repressor of *Escherichia coli*. J Mol Biol 256: 377-391.
- Vences-Guzmán MA, Guan Z, Ormeño-Orrillo E, González- Silva N, López-Lara IM, Martínez-Romero E, Geiger O and Sohlenkamp C. 2011. Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. Mol Microbiol 79: 1496–1514.
- Villaseñor T, Brom S, Dávalos A, Lozano L, Romero D and Garcia-De Los Santos A. 2011. Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in *Rhizobium etli* and *Rhizobium leguminosarum*. BMC Microbiol 11: 66.
- Viola RE. 2001. The central enzymes of the aspartate family of amino acid biosynthesis. Acc Chem Res 34: 339-49.
- Vogel HJ. 1970. Arginine biosynthetic system in *Escherichia coli*. Methods Enzymol 17A: 249-251.
- Vogel HJ and Bonner DM. 1956. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. J. Biol Chem 1956 218: 97
- Vogel HJ and McLellan WL. 1970. N-acetyl- γ -glutaminokinase (*Escherichia coli*). Methods Enzymol 17A: 251-255.
- Vogel HJ and McLellan WL. 1971. Acetylornithinase (*Escherichia coli*). Methods Enzymol 17A: 265-269.
- Vollmer W. 2012. Bacterial outer membrane evolution via sporulation? Nat Chem Biol 8: 14-818.
- Walker MC and van der Donk WA. 2016. The many roles of glutamate in metabolism. J Ind Microbiol Biotechnol 43: 419-30
- Wang H, Glansdorff N and Charlier D. 1998. The arginine repressor of *Escherichia coli* K-12 makes direct contacts to minor and major groove determinants of the operators. J Mol Biol 277: 805-24.
- Wendisch VF. 2007. Amino acid biosynthesis-pathways, regulation and metabolic engineering. Ed. Springer: Berlin 5: 413 pp.
- Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G and Funck D. 2015. Physiological implications of arginine metabolism in plants. Front Plant Sci 6:534.
- Xu M, Rao Z, Dou W, Yang J, Jin J and Xu Z. 2012. Site-directed mutagenesis and feedback-resistant N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) increase *Corynebacterium crenatum* L-arginine production. Amino Acids 43: 255-266.
- Xu Y, Glansdorff N and Labedan B. 2006. Bioinformatic analysis of an unusual gene-enzyme relationship in the arginine biosynthetic pathway among marine γ proteobacteria: Implications concerning the formation of N-acetylated intermediates in prokaryotes. BMC Genomics 7: 1-14.
- Xu Y, Liang Z, Legrain C, Ruger HJ and Glansdorff N. 2000. Evolution of arginine biosynthesis in the bacterial domain: novel gene enzyme relationship from psychophilic *Moritella* strains (*Vibrionaceae*) and the evolutionary significance of N- α -acetylornithinase. J Bacteriol 182: 1609-1615.

- Xu Y, Sun Y, Huysveld N, Gigot D, Glansdorff N, Charlier D. 2003. Regulation of arginine biosynthesis in the psychropiezophilic bacterium *Moritella profunda*: *in vivo* repressibility and *in vitro* repressor-operator contact probing. *J Mol Biol* 326: 353-369.
- Xu Y, Labedan B and Glansdorff N. 2007. Surprising Arginine Biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. *Microbiol Mol Biol R* 71: 36-47.
- Yakobsone A and Guiney DG. 1984. Conjugal transfer of bacterial chromosomes mediated by the RK2 plasmid transfer origin cloned into transposon Tn5. *J. Bacterial* 160: 451-453.
- Yang J and Zhang Y. 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Research*, 43: W174-W181.
- Zhang J. 2012. Genetic redundancies and their evolutionary maintenance. *Adv Exp Med Biol* 751: 279-300.
- Zhang Y and J Skolnick J. 2005. TM-align: A protein structure alignment algorithm based on TM-score. *Nucleic Acids Research* 33: 2302-2309.
- Zinoni F, Birkmann A, Stadtman TC and Bock A. 1986. Nucleotide sequence and expression of the selenocysteine-containing polypeptide of formate dehydrogenase (formatehydrogen-lyase-linked) from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4650-4654.