# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

## CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y BIOQUÍMICA DE LA VÍA DE LA ARGINASA EN *Sinorhizobium meliloti* Rm1021

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

PRESENTA:
ALEJANDRA IVETTE ARTEGA IDE

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

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:
DR. ISMAEL HERNÁNDEZ LUCAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DRA. MARIA DE LOURDES GIRARD CUESY
CENTRO DE CIENCIAS GENOMICAS

CUERNAVACA, MORELOS, OCTUBRE DE 2021

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**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 (290118).

A la Dirección General Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM (PAPIIT) por financiar el proyecto de investigación (IN208811, IN210114, IN206317).

Al Dr Víctor Antonio Becerra por las recomendaciones y asesoría en algunos experimentos realizados.

## RESUMEN

En las bacterias, la L-arginina (L-Arg) además de ser un componente estructural de las proteínas, es un precursor de varios metabolitos como, antibióticos, sideróforos, poliaminas, cianoficina, lípidos y peptidoglicano. Aunado a lo anterior, también funge como fuente de carbono y/o nitrógeno. Debido a la importancia que representa el aminoácido en las bacterias, su estudio ha sido del interés de diferentes campos de la ciencia, llegando a la elucidación de tres vías de biosíntesis y cinco de degradación. Una de las rutas degradativas ampliamente distribuidas en la biosfera es la arginasa, la cual transforma inicialmente la L-Arg en L-ornitina (L-Orn) y urea por medio de la enzima arginasa, la cual es dependiente de un catión divalente para su actividad (EC 3.5.3.1). Debido a su relevancia en el control de ambos aminoácidos a nivel intracelular, su estudio ha sido amplio en el género *Bacillus* y *Helicobacter*. En rizobias, las cuales son bacterias capaces de reducir el dinitrógeno atmosférico ($N_2$) cuando se asocian de forma simbiótica con plantas leguminosas, la enzima no ha sido caracterizada. Con base en lo anterior se realizó la caracterización genética y bioquímica de la arginasa de *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, lo cual se asocia a plantas del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonela*. Esta bacteria tiene dos genes anotados como arginasas, una ubicada en el cromosoma (*argI1, smc03091*) y otra en el megaplásmido pSymA (*argI2, sma1711*). Por medio se ensayos de actividad enzimática con ambas proteínas purificadas, se demostró que únicamente la 6His-Sumo-Arg1 es activa y que su mutación por medio de la interrupción de su ORF con un casete de Sp, resultó en una cepa sin actividad detectable de arginasa y con una velocidad de crecimiento específico de 21 %, respecto a la cepa silvestre, cuando el medio de cultivo contenía succinato y L-Arg como fuente de

carbono y nitrógeno, respectivamente (MMSA). El fenotipo silvestre fue restaurado por la complementación genética, a través de la integración de *argI1* en el genoma. Los ensayos de actividad transcripcional usando el gen reportero *gusA* y de actividad enzimática, demostraron que la expresión y la actividad de arginasa fueron inducidos por la presencia de L-Arg exógena hasta un 540 y 430 %, respectivamente, comparada con el medio sin suplementar. Por medio de la inactivación del gen *smc03092* (*argIR*), anotado como un regulador tipo Lrp, el cual se encuentra de manera divergente a *argI1*, se demostró su producto regula de forma positiva la expresión de *argI1* en presencia de L-Arg, ya que en su ausencia aún existe una expresión basal, pero no se induce por la presencia del aminoácido. Por medio de ensayos en el retraso de la movilidad electroforética (EMSA), utilizando la región intergénica comprendida entre los nucleótidos-190 y -108 río arriba del inicio de la traducción de *argI1* y la 6His-Sumo-ArgIR purificada, se encontró que la regulación es directa. La inactivación del *argI*R por medio de la interrupción de su ORF con un casete de Sp, no mostró un fenotipo distinto a la cepa silvestre cuando se utilizó el MMSA. Posteriormente se observó que la enzima purificada existe principalmente como trímeros, basados en la migración de la proteína en un gel de poliacrilamida nativo con un aumento gradual en la concentración de urea. Los ensayos de actividad enzimática con distintos cofactores, demostró que la mayor actividad enzimática en un pH de 7 a 8.4 fue con $Ni^{2+}$, mientras que de 8.5 a 10.5 con $Mn^{2+}$. Además, se determinó la $K_{mArg}$ en presencia de $Ni^{2+}$, $Mn^{2+}$ y $Co^{2+}$, mostrando que sus valores son similares a las de otras arginasas bacterianas ya caracterizadas. Con base en los resultados se concluyó que ArgI1 es la única arginasa

presente en *S. meliloti* Rm1021, que contribuye en el catabolismo de la L-Arg en condiciones aeróbicas, la cual es inducida por ArgIR en presencia del aminoácido.

## ABSTRACT

In bacteria, L-arginine (L-Arg) in addition to being a structural component of proteins, is a precursor of several metabolites such as antibiotics, siderophores, polyamines, cyanophycin, lipids and peptidoglycan. In addition to the above, it also serves as a source of carbon and / or nitrogen. Due to the relevance of the amino acid in bacteria, its study has been of interest to different fields of science, resulting in the elucidation of three biosynthesis and five degradation pathways. One of the degradative pathways widely distributed in the biosphere is arginase, which initially transforms L-Arg into L-ornithine (L-Orn) and urea through the enzyme arginase, which is dependent on a divalent cation for its activity (EC 3.5.3.1). Due to its relevance in controlling the level of both amino acids at the intracellular level, its study has been extensive in the genus *Bacillus* and *Helicobacter.* In rhizobia, which are bacteria capable of reducing atmospheric dinitrogen ($N_2$) when symbiotically associated with legume plants, the enzyme has not been characterized. Based on the above, the genetic and biochemical characterization of arginase from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 was carried out, which is associated with plants of the genus *Medicago*, *Melilotus* and *Trigonela*. This bacterium has two genes annotated as arginases, one located on the chromosome (*argI1, smc03091*) and the other on the megaplasmid pSymA (*argI2, sma1711*). Througt enzymatic activity assays with both purified proteins, it was shown that only 6His-Sumo-Arg1 was active and that its mutation by interrupting its ORF with an Sp cassette resulted in a strain without detectable arginase activity and with a specific growth speed of 21%, compared to the wild strain, when the culture medium contained succinate and L-Arg as a carbon and nitrogen source, respectively (MMSA). The wild type phenotype was restored by genetic

complementation, through the integration of argI1 into the genome. Transcriptional activity assays using the *gusA* reporter gene and enzymatic activity showed that arginase expression and activity were induced by the presence of exogenous L-Arg up to 540 and 430%, respectively, compared to unsupplemented medium. Through the inactivation of the gene *smc03092* (*argIR)*, annotated as an Lrp-like regulator, which is found in a divergent to *argI1*, It was demonstrated that the gene positively regulates the expression of *argI1* in presence of L-Arg, since in its absence there is still a basal expression, which does not change with the presence of the amino acid. By means of electrophoretic mobility shift assay (EMSA), using the intergenic region between nutleotides -190 and -108 upstream of the initiation of the translation of *argI1* and purified 6His-Sumo-ArgIR, it was found that the regulation is direct. The inactivation of the regulator by means of the interruption of its ORF with an Sp cassette did not show a phenotype different from the wild strain when the MMSA was used. Subsequently it was observed that the enzyme exists mainly as trimers, based on the migration of the protein in a polyacrylamide gel with a gradual increase in the urea concentration. The enzymatic activity tests with different cofactors showed that the highest enzymatic activity at a pH of 7 to 8.4 was with $Ni^{2+}$, while from 8.5 to 10.5 with $Mn^{2+}$. Additionally, the $K_{mArg}$ was also determined in the presence of $Ni^{2+}$, $Mn^{2+}$ and $Co^{2+}$, showing that their values are similar to those of other bacterial arginases already characterized. Based on the results, it was concluded that ArgI1 is the only arginase present in *S. meliloti Rm1021,* which contributes to the catabolism of L-Arg under aerobic conditions, which is induced by ArgIR in the presence of the amino acid.

**INDICE**

1. Introducción ..... 1
2. Antecedentes ..... 4
2.1 L-arginina ..... 4
2.2 Vías de biosíntesis de L-Arg ..... 6
2.3 Vías de degradación de L-Arg ..... 7
2.3.1 Vía de la arginina deiminasa ..... 9
2.3.2 Vía de la arginina succiniltransferasa ..... 9
2.3.3 Vía de la arginina transaminasa/oxidasa/deshidrogenasa ..... 10
2.3.4 Vía de la arginina descarboxilasa ..... 10
2.3.5 Vía de la arginasa ..... 11
2. 4 La enzima arginasa ..... 12
2.4.1 Generalidades de la enzima ..... 12
2.4.2 Regulación genética ..... 13
2.4.3 Propiedades estructurales ..... 21
2.4.3 Características bioquímicas ..... 27
2.5 Fijación de nitrógeno ..... 31
2.5.1 Las leguminosas y rizobias ..... 33
2.5.2 El proceso de nodulación ..... 33
2.5.3 Importancia del metabolismo de la L-Arg en la simbiosis ..... 35
2.6 Planteamiento del problema y justificación ..... 41
3. Hipótesis ..... 43
4 Objetivo ..... 44
4.1 General ..... 44
4.2 Especifíco ..... 44
5. Metodología ..... 45
6. Resultados ..... 46
6.1 *argI1* es funcional *in vitro* ..... 46
6.2 *argI1* es importante en el crecimiento en vida libre ..... 47
6.2 La L-Arg induce la expresión de *argI1* ..... 48
6.3 *argIR* (*smc03092*) regula positivamente la expresión de *argI1* ..... 50
6.4 La expresión de *argIR* no aumenta en presencia de L-Arg ..... 52
6.5 ArgIR se une a la región regulatoria de argI1 ..... 53

6.6 *argIR* no es indispensable en vida libre ..... 56
6.7 Caracterización bioquímica de ArgI1 ..... 56
6.7.1 Peso molecular y estado oligomrico ..... 56
6.7.1 Cofactores ..... 57
6.7.2 pH ..... 57
6.7.3 $K_m$ y $V_{max}$ ..... 58
7. Discusión ..... 60
7.1 ArgI1 es funcional ..... 60
7.2 Función de ArgI1 en vida libre ..... 61
7.3 Inducción y regulación genetica de *argI1* ..... 63
7.4 Características bioquímicas de A ..... 65
8. Conclusiones ..... 68
9. Recomendaciones ..... 69
10. Anexo ..... 70
11. Literatura citada ..... 84

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de L-Arg. ..... 4
Figura 2. Metabolitos secundarios generados a partir la L-Arg u L-Orn en bacterias.. ..... 6
Figura 3. Esquema de la biosíntesis de la L-Arg en bacterias.. ..... 8
Figura 4. Ruta de la arginasa en *B. subtilis*. ..... 12
Figura 5. Esquema de la estructura de los reguladores genéticos que participan en la transcripción de los genes *roc.* ..... 14
Figure 6. Secuencias intergénicas de los operones *roc*.. ..... 15
Figura 7. Secuencias de DNA reconocidas por proteínas tipo Lrp. ..... 21
Figura 8. Estructura secundaría de los monómeros de tres arginasas bacterianas.. ..... 22
Figura 9. Estados oligomericos reportados para las arginasas bacterianas. . ..... 24
Figura 10. Centro binuclear de tres arginasas bacterianas. ..... 26
Figura 11. Mecanismo propuesto para la hidrólisis de la L-Arg. ..... 32
Figura 12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las arginasas..... 47
Figura 13. Actividad de arginasa del extracto total de diferentes genotipos de *S. meliloti*. 48
Figura 14. Cinética de crecimiento de diferentes genotipos de *S. meliloti* ..... 50
Figura 15. Actividad específica de GusA del extracto total para el promotor de *argI1* de la cepa 1021. ..... 51
Figura 16. Actividad específica de GusA del extracto total para el promotor de *argI1* en las cepas 1021 y 1021 argIR ..... 52
Figura 17. Actividad específica de GusA del extracto total para el promotor de *argIR*. ..... 53
Figura 18. Análisis de la región intergénica de *argI1*.. ..... 54
Figura 19. Arreglo genético de *argI1* y *argIR*. ..... 54
Figura 20. EMSA realizado con F1, F2 y diferentes concentraciones de 6His-Sumo-ArgIR.. 55
Figura 21. Actividad específica relativa de 6His-Sumo-ArgI1 en presencia de diferentes cationes metálicos divalentes. ..... 57
Figura 22. Actividad específica relativa de la 6His-Sumo-ArgI1 en presencia de $Ni^{2+}$, $Co^{2+}$ y $Mn^{2+}$, bajo diferentes condiciones de pH. ..... 58
Figura 23. Secuencias de DNA para la unión de las proteínas tipo Lrp ..... 65

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características bioquímicas de las arginasas bacterianas. ..... 29
Tabla 2. Velocidad específica de crecimiento de diferentes cepas de *S. meliloti*. ..... 50
Tabla 3. Parámetros cinéticos de 6His-Sumo-ArgI1 con tres diferentes cofactores. ..... 59

## LISTA DE ABREVIATURAS Y CLAVES

| | |
|---|---|
| –COOH: | Grupo carboxilo |
| $–NH3^{+}$: | Grupo amino |
| $\sigma^{54}$: | Factor sigma 54 |
| $\sigma^{A}$: | Factor sigma A |
| $\sigma^{L}$: | Factor sigma L |
| ˚C: | Grados centígrados |
| 2KG: | 2-ketoglutarato |
| $AAA^{+}$: | ATPasa asociada con diversas actividades celulares |
| ADC: | Vía de la arginina descarboxilasa |
| ADH: | Arginina deshidrogenasa |
| ADI: | Vía de la deiminasa |
| Agm | Agmatina |
| AhrC: | Regulador del metabolismo de la L-Arg en *Bacillus* |
| *arcA*: | Arginina deiminase |
| *arcB*: | Ornitina transcarbamilasa |
| *arcC*: | Carbamato quinase |
| *arcD*: | Antiportador de L-Arg y L-Orn |
| ARG: | Arginasa |
| ArgA: | *N*-acetilglutamato sintasa |
| ArgAB: | *N*-acetilglutamato sintasa-quinasa |
| ArgB: | *N*-acetilglutamato quinasa |
| ArgC: | *N*-acetilglutamato 5-fosforeductasa |
| ArgD: | *N*-acetilornitina aminotransferasa |
| ArgE: | *N*-acetilornitina deacetilase |
| ArgF: | Ornitina transcarbamoilasa |
| ArgG: | Ornitina transcarbamoilasa |
| ArgH: | Argininosuccinato liasa |
| ArgIR: | Regulador transcripcional de ArgI1 |
| ArgJ: | *N*-ornitina acetiltransferasa |
| ArgR: | Regulador del metabolismo de la L-Arg |
| AruC: | *N*-succinilornitina 5-aminotransferasa |
| AruD: | *N*-succinilglutamato 5-semialdeido deshidrogenasa |
| AruF y AruG: | arginina/ornitina $N^{2}$-succiniltransferasa |
| *asnA*: | Gen de la asparagina sintetasa |
| AST: | Vía de la arginina succiniltransfera |
| ATP: | Adenosín trifosfato |
| BNF: | Fijación biológica de nitrógeno |
| Cα | Carbono alfa |
| Cad | Cadaverina |
| *carA*: | Subunidad pequeña de la CPS |
| *carB*: | Subunidad grande de la CPS |
| CBD: | Core binding domain |
| CK: | Carbamato quinasa |

| | |
|---|---|
| CPS: | Carbamoil fostato sintasa |
| C**ζ**: | Carbono zeta |
| D-Arg | D-Arginina |
| ELH-HTH: | Dominio hélice vuelta hélice extra-larga |
| EMSA: | Ensayo de movilidad electroforética |
| Factor Nood: | Molécula señal producida y secretada por las rizobias |
| GusA: | enzima β-glucuronidasa |
| *gusA*: | Gen de la β-glucuronidasa |
| h: | Hora |
| HipO: | Hipurato hidrolasa |
| *hpdA* | Gen de 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa |
| HpdA: | Enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa |
| *hpdR* | Gen de HpdR |
| HpdR | Regulador transcripcional de HpdA |
| IHF: | Factor de integración del huesped |
| $K_{0.5}$: | Afinidad aparente del sustrato |
| $k_{cat}$: | Número de recambio |
| kDa: | Kilo Dalton |
| $K_{mArg}$ | Constante de Michaelis-Menten para la arginasa |
| L-Arg: | L-Arginina |
| L-Asp : | L-Asparagina |
| L-Cit: | L-Citrulina |
| L-Glu | L-Glutamato |
| L-Iso: | L-Isoleucina |
| L-Lys | L-Lisina |
| L-Orn: | L-Ornitina |
| L-Trp | L-Triptófano |
| L-Val: | L-Valina |
| Lrp: | Proteína regulatoria de respuesta a leucina (Lrp) |
| LysR: | Familia de reguladores transcripcionales más abundantes en procariontes |
| MMS-Arg: | Medio mínimo succinato-L-Arg |
| MMS-Orn: | Medio mínimo succinato-L-Orn |
| MMSA: | Medio mínimo succinato-amonio |
| $N_2$: | Dinitrógeno atmosférico |
| NAC: | $N^2$-acetilcitrulina |
| NAD: | Dinucleótido de nicotinamida y adenina |
| NAG: | *N*-acetilglutamato |
| NAO: | $N^2$-acetilornitna |
| NBS: | *N*-bromosuccinimida |
| $NH_3$: | Amoniaco |
| $NH_4^+$: | Ion amonio |
| NodD: | Regulador transcripcional de los genes *nod* |
| $NO_x$: | Óxidos de nitrógeno |
| nt: | Nucleótidos |

| | |
|---|---|
| N**ε**: | Nitrógeno épsilon |
| OCD: | Ornitina ciclodeaminasa |
| OTC: | Ornitina transcarbamilasa |
| PAS: | Dominio estructural originalmente caractarizado en las proteinas: Per-Arnt Sim |
| PDB: | Banco de datos de proteínas |
| pH: | Potencial de hidrógeno |
| pI: | Punto isoeléctrico |
| p*K*: | Logaritmo negativo de la constante de equilibrio |
| p$K_a$: | Constante de disociación ácida |
| Put | Putrescina |
| *putA*: | Gen de la prolina deshidrogenasa |
| PutR: | Regulador transcripcional de la prolina deshidrogenasa |
| RAM: | Dominio de regulación del metabolismo de aminoácidos |
| RocA: | 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa |
| RocD: | Ornitina aminotrasferasa |
| RocF: | Enzima arginasa |
| *rocF*: | Gen de la arginasa |
| rocG: | Gen de la glutamato dehidrogenasa |
| RocG: | Glutamato dehidrogenasa |
| RocR: | Activador de sigma-54 con dominio de degradación de c-di-GMPc necesario para la expresion de los genes *roc* |
| SUA: | Sitio de unión de ArgIR |
| UAS: | Siio de union de las preoteinas activadoras del factor sigma 54 |
| $V_{max}$: | Velocidad máxima |

# 1. INTRODUCCIÓN

La L-Arg es un aminoácido cuyas características fisicoquímicas le permiten realizar diversas funciones dentro de la célula bacteriana. Además de ser un componente estructural de las proteínas y en algunos casos parte del sitio activo de algunas enzimas, el aminoácido es un precursor del peptidoglicano, cianoficina, antibióticos, sideróforos, lípidos y poliaminas (Füser y Steinbüchel 2007; Robbel et al. 2011; Vollmer 2011; Abraham et al. 2014; Becerra-Rivera y Dunn 2019; Sohlenkamp 2019; Hernández et al. 2021).

Dada la importancia del metabolismo de la L-Arg en la fisiología bacteriana, su estudio en los últimos 60 años ha llevado al descubrimiento de tres vías anabólicas y cinco catabólicas. Las rutas de biosíntesis son la lineal, la del reciclaje del grupo acetilo y la de $N^2$-acetilcitrulina (NAC), las cuales se diferencian principalmente en el punto de regulación del flujo metabólico a nivel bioquímico y la desacetilación de la $N^2$-acetilornitna (NAO) o N-acetilcitrulina (NAC) (Xu et al 2007; Hernández 2020). En cuanto a las vías de degradación, se han reportado las vías de la arginasa (ARG), arginina deiminasa (ADI), arginina deshidrogenasa (ADH), arginina descarboxilasa (ADC) y arginina succiniltransfera (AST). Cada una de estas rutas cumple con una función específica, permitiendo la utilización de la L-Arg como fuente de nitrógeno, carbono y/o energía, en condiciones aeróbicas o anaerobias (Cunin et al. 1986; Lu 2006; Hernández et al. 2021).

En *Bacillus subtilis* la ruta de la arginasa ha sido estudia extensivamente, revelando que está compuesta por dos operones (*rocABC* y *rocDEF*) y un gen (*rocG*), los cuales en conjunto permiten la importación y transformación de la L-Arg hasta 2-ketoglutarato (2KG) (Gardan et al. 1995; Belitski y Sonenshein 1999, Hernández et al. 2021). Los siete genes a nivel transcripcional

son regulados por el factor sigma L ($\sigma^L$), AhrC y RocR. El primero es un homólogo del factor sigma 54 ($\sigma^{54}$), encontrado en bacterias Gram negativas e involucrado en el metabolismo del nitrógeno, mientras que el segundo es el regulador de los genes que participan en metabolismo de la L-Arg y el tercero es una proteína de unión al potenciador bacteriano (Debarbouille et al. 1991; Gardan et al. 1995; 1997; Zaprasis et al. 2014)

El péptido codificado por el gen *rocF*, es la arginasa, la cual es una enzima que hidroliza la L-Arg en L-Orn y urea (EC 3.5.3.1). A nivel estructural la proteína presenta un plegamiento $\alpha/\beta$, siendo parte de la superfamilia de la ureohidrolasa. En bacterias los monómeros de la enzima suelen formar complejos de seis unidades, lo que difiere de la de humanos y rata, que forman trímeros. Para que la enzima sea catalíticamente activa, es necesaria la presencia de dos cationes divalentes en el sitio activo de cada monómero (usualmente $Mn^{2+}$), los cuales son unidos a la proteína por medios de residuos encontrados en los motivos GGDHS, DAHXD y SXDXDXXDP, característicos de las arginasas, tanto de bacterias como eucariontes. Los cationes divalentes forman un puente metálico, que durante la catálisis desprotona una molécula de agua, para formar un anión hidróxido y que funciona como nucleófilo catalítico (Bewley et al. 1999; Ash 2004, Christianson et al.2005; Dowling et al.2008; Velázquez-Libera et al. 2020; Hernández et al 2021).

A pesar de que la enzima ha sido estudiada en 13 especies de bacterias, la mayoría de los trabajos han sido realizados en el género *Bacillus* y *Helicobacter*. Un grupo de bacterias donde el estudio de la arginasa sería de relevancia, son las rizobias, las cuales pueden tener un estilo de vida en forma libre o en simbiosis con leguminosas, bajo la cual realizan la reducción del

dinitrógeno atmosférico ($N_2$) (Dunn 2015). Un trabajo realizado en *S. meliloti* Rm1021 como modelo de estudio, ayudaría entender el papel que juega la enzima en el balance intracelular de la L-Arg y L-Orn, durante su fase de vida libre, nodulación y fijación de nitrógeno, así como el mecanismo de regulación a nivel genético y/o bioquímico.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 L-ARGININA

La L-Arg es un aminoácido básico, cargado positivamente y muy polar en condiciones fisiologícas, con valores de p$K_a$ de 2.17, 9.04 y 12.48 para el grupo carboxilo (–COOH), amino (–$NH3^+$) y R, respectivamente. El aminoácido tiene un peso molecular de 174.2 g $mol^{-1}$, pI de 10.76 e índice hidropático de -4.5 (Figura 1) (Cozzone 2010). Estas características fisicoquímicas le permiten realizar diversas funciones a nivel celular en distintas bacterias.

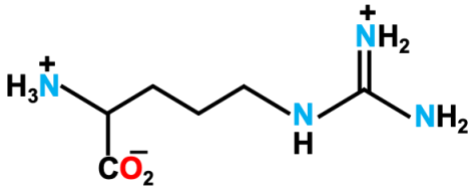

**Figura 2.** Molécula de L-Arg. En color azul se muestran los átomos de nitrógeno y en rojo los de oxígeno.

En *Escherichia coli* la L-Arg ocupa cerca del 5 % del proteoma, donde es un componente estructural y en algunos casos parte del sitio activo de las enzimas. En condiciones de crecimiento anaerobias en un medio complejo, es importante en la tolerancia al pH ácido (Gong et al. 2003; Richard y Foster 2004). Por otra parte, en cianobacterias y algunas bacterias heterotróficas, el aminoácido forma parte de la cianoficina (Figura 2A), el cual es un polímero que sirve de almacenamiento de nitrógeno, carbono y reserva de energía (Füser y Steinbüchel 2007; Maheswaran et al. 2006).

La L-Arg también es utilizada en la biosíntesis de algunos antibióticos como el ácido clavulánico en *Streptomyces clavuligerus* de forma directa (Figura 2B) (Song et al. 2010) e indirecta a través

de la L-Orn en la bacitracina en *Bacillus licheniformis* (Figura 2C) (Zarei 2012) y gramicidina en *Bacillus brevis* (Abraham et al. 2014). La L-Orn es un aminoácido no proteogénico que se forma durante la biosíntesis y degradación de la L-Arg, este forma parte de los lípidos de ornitina presentes en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, en condiciones de bajo fosfato (Figura 2D) (Sohlenkamp 2019). Además, puede formar parte de la subunidad peptídica del peptidoglicano de la pared celular (Figura 2E) (Vollmer 2011). El aminoácido es precursor de los sideróforos como la eritroqueletina en *Saccharopolyspora erythraea* (Figura 2F) (Robbel et al. 2011), rodoqueletina en *Rhodococcus jostii* (Bosello et al. 2011) y coeliquelina en *Streptomyces coelicolor* (Challis y Ravel 2000) por citar algunos, los cuales son agentes quelantes de fierro.

La putresina (Put) (Figura 2G) es una poliamina sintetizada a partir de la L-Orn por medio de la ornitina descarboxilasa (ODC, EC 4.1.1.17), pero también a partir de la L-Arg por la acción conjunta de la arginina descarboxilasa (ADC, EC 4.1.1.19) y agmatinasa (EC 3.5.3.11). La Put es un precursor de otras poliaminas como la espermidina, homoespermidina y norespermidina (Becerra-Rivera y Dunn 2019).

De forma similar a la L-Orn, la L-citrulina (L-Cit) se sintetiza durante la biosíntesis y degradación de la L-Arg. Este aminoácido está involucrado en la tolerancia al estrés ácido a través de la $F_0F_1$ ATPasa, la cual utiliza el ATP generado por la degradación del aminoácido para exporta los protones del citoplasma al medio (Cusomano et al. 2015).

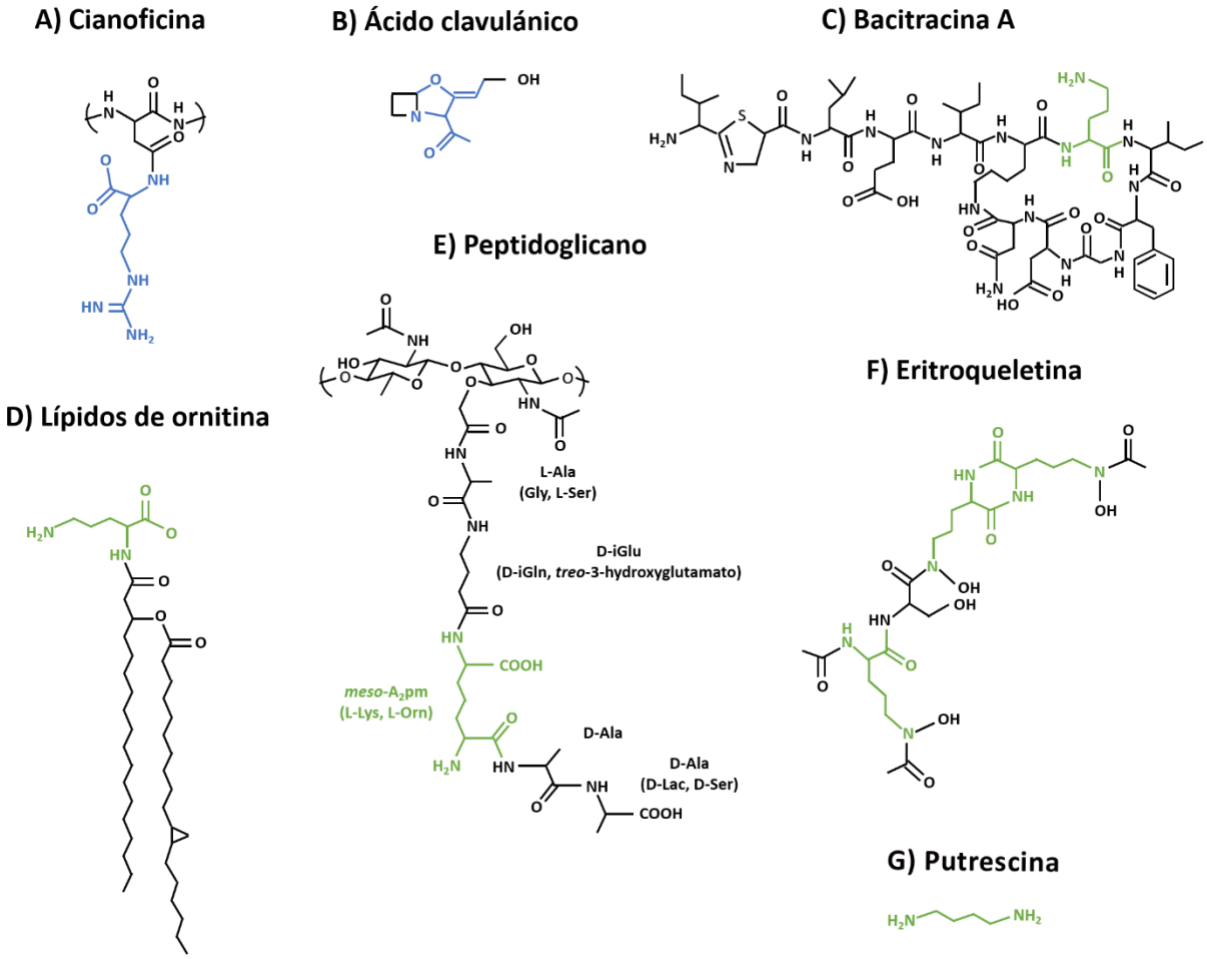


Figura 2. Metabolitos secundarios generados a partir la L-Arg (azul) u L-Orn (verde) en bacterias. Cabe destacar que la Put puede ser sintetizaba a partir de ambos aminoácidos.

Debido a las múltiples funciones que la L-Arg cumple dentro de las bacterias, el estudio de su metabolismo ha sido extenso en los últimos 60 años, lo cual ha llevado al descubrimiento de 5 rutas degradativas y 3 de biosíntesis. (Cunin et al. 1986, Xu et al. 2007).

## 2.2 VÍAS DE BIOSÍNTESIS DE L-Arg

La biosíntesis del aminoácido procede a través de ocho pasos, los cuales pueden diferir en la formación de ciertos intermediarios y regulación del flujo metabólico en bacterias, dando origen a tres rutas: lineal, reciclaje y NAC (Figura 3). En la lineal los primeros cuatro intermedarios están

acetilados, donde el grupo acetilo de la NAO es retirado por una ArgE y la regulación bioquímica es por medio de la inhibición alostérica con L-Arg de la ArgA. Está ruta se encuentra en enterobacterias y *Myxococcus xanthus* (Harris y Singer 1998; Javid-Majd y Blanchard 2000; Shi et al. 2008). La vía del reciclaje, donde el grupo acetilo es reutilizado para la síntesis del *N*-acetilglutamato (NAG), a través de la ArgJ y su regulación bioquímica es por medio de la inhibición con L-Arg en la ArgB. Esta ruta se encuentra en la mayoría de las bacterias (Marc et al. 2000; Xu et al. 2007). La tercera ruta consiste de cinco intermediarios acetilados, donde la NAC es desacetilada por una ArgE' y su regulación ocurre en la bifuncional *N*-acetilglutamato sintasa-quinasa (ArgAB, EC 2.3.1.1, EC:2.7.2.8) por L-Arg. La vía se encuentra en *Xanthomonas campestris* y *Xylella fastidiosa* (Qu et al. 2007; Shi et al. 2011; Xu et al. 2007; Hernández 2020).

## 2.3 VÍAS DE DEGRADACIÓN DE L-Arg

En bacterias existen cinco vías de degradación para L-Arg: i) la vía de la arginasa, ii) arginina deiminasa (ADI), iii) arginina deshidrogenasa (ADH), iv) arginina descarboxilasa (ADC) y v) arginina succiniltransfera (AST) (Abdelal 1979; Cunin et al. 1986; Lu 2006) (Figura 3). En algunos casos, múltiples vías pueden encontrarse en una sola especie bacteriana, como en el caso de *Pseudomonas putida* o *Pseudomonas aeruginosa* (Jann 1988).

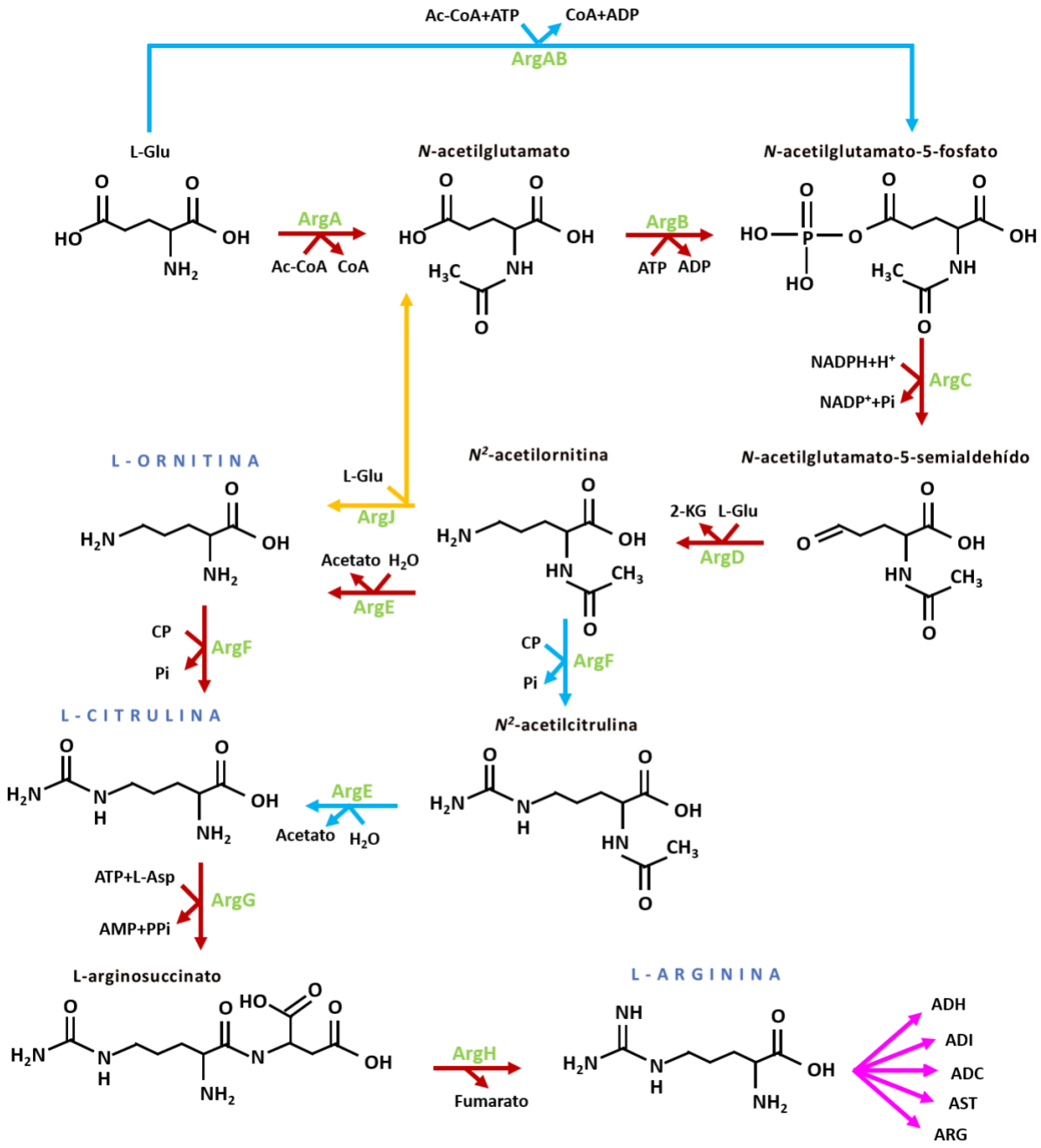


Figura 3. Esquema de la biosíntesis de la L-Arg en bacterias. Las flechas en color rojo representan a la ruta lineal, las azules y amarillas los pasos que caracterizan a la ruta de la $N^2$-acetilcitrulina y del reciclaje, respectivamente. Las rutas de degradación son representadas con flechas en color rosa. ADH: arginina oxidasa/ deshidrogenasa/ transaminasa, AST: arginina succinilasa, ADI: arginina deiminasa, ARG: arginasa, ADC: arginina descarboxilasa, CP: carbamoil fosfato y 2-KG: 2-ketoglutarto (modificado de Hernández 2020).

### 2.3.1 VÍA DE LA ARGININA DEIMINASA

La vía de la arginina deiminase (ADI) es utilizada por diversos microorganismos para la generación de ATP a partir de L-Arg de forma fermentativa. Fue caracterizada por primera vez en *P. aeruginosa*, donde los genes forman el operón *arcDABC*. El gen *arcA* codifica para una arginina deiminase (ADI, EC 3.5.3.6), el *arcB* para una ornitina transcarbamilasa (OTC, EC 2.1.3.3) y el *arcC* para una carbamato quinasa (CK, EC 2.7.2.2). El operón también incluye un cuarto gen, el *arcD* que codifica para un antiportador de L-Arg y L-Orn (Verhoogt 1992). Las funciones de la vía son la generación de ATP, amonio y la tolerancia a condiciones acidas. El operón *arc* está ampliamente distribuido en bacterias como por ejemplo *Lactobacillus sake* (Zuñiga et al. 2002), *B. licheniformiis* (Maghnouj et al. 1998) y *Rhizobium etli* (D'Hooghe et al. 1997). Aunque también se ha encontrado en Archaeas como *Halobacterium salinarium* (Ruepp y Soppa 1996) y eucariontes unicelulares como los de la clase Parabasalia y Diplomonadida (Novák et al. 2016).

### 2.3.2 VÍA DE LA ARGININA SUCCINILTRANSFERASA

Es la principal vía de degradación de L-Arg bajo condiciones aeróbicas en *P. aeruginosa*, produciendo L-Glutamato (L-Glu) y succinato (Jann et al. 1988). En dicha bacteria los genes de la vía están en un operón denominado *aruCFGDBE*, que codifica para la *N*-succinilornitina 5-aminotransferasa (AruC, EC 2.6.1.81) y la arginina/ornitina $N^2$-succiniltransferasa (AruF y AruG, EC 2.3.1.109), *N*-succinilglutamato 5-semialdehído deshidrogenasa (AruD, EC 1.2.1.71), *N*-succinilarginina dihidrolasa (AruB, EC 3.5.3.23) y *N*-succinilglutamato desuccinilasa (AruE, EC 3.5.1.96) (Itho 1997). La identificación del operón *aru* en *P. aeruginosa,* permitió el descubrimiento de homólogos en bacterias entéricas como *E. coli, Salmonella typhi,* S*almonella typhimurium* y *Yersinia pestis*. En *E. coli* y *S. typhimurium* el operón homólogo de *aru* (*astCADBE*)

es esencial para el crecimiento en L-Arg como fuente de nitrógeno. El operón *ast* también es inducido bajo condiciones de inanición de carbono, lo que solo podría servir para mantener la supervivencia celular (Schneider et al. 1998; Lu y Abdelal 1999).

### 2.3.3 VÍA DE LA ARGININA TRANSAMINASA/OXIDASA/DESHIDROGENASA

Las enzimas de la vía fueron reportadas por primera vez en *P. putida* (Fan y Rodwell 1975; Vanderbilt et al. 1975) y es la segunda en importancia en cuanto a la utilización de L-Arg como fuente de carbono o nitrógeno en la bacteria después de la arginina succinil transferasa (Tricot 1991). Las enzimas que componen la vía son arginina oxidase (EC 1.4.3.25), 2-ketoarginina descarboxilase (EC 4.1.1.75), 4-guanidinobutir-aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.54) y 4-guanidinobutirasa (EC 3.5.3.7) (Lu 2006). La deaminación oxidativa por la arginina oxidasa deshidrogenasa produce 2-ketoarginina, que posteriormente es catabolizada en succinato. La ruta degradativa ha sido estudiada también en *Pseudomonas fluorescens* y algunas cianobacterias (Quintero et al. 2000).

### 2.3.4 VÍA DE LA ARGININA DESCARBOXILASA

La principal función de la vía es la producción de poliaminas, los cuales son compuestos policatiónicos que contienen dos o más grupos amino, cargados positivamente a pH fisiológico con diversas funciones celulares en los organismos, uno de los papeles más importantes es el crecimiento y proliferación celular (Michael 2016) La descarboxilación de la L-Arg por la arginina descarboxilasa produce agmatina (Agm), la cual es una poliamina que da origen a la Put por medio de la agmatinasa. Esta poliamina es esencial para el crecimiento de *Ralstonia solanacearum,* cuando crece en la sabia del xilema de tomate, provocando la enfermedad del

marchitamiento bacteriano (Lowe-Power et al. 2018). Además, en *P. aeruginosa* la Put, que puede ser catabolizada hasta la formación del succinato, proceso en el cual también se genera L-Alanina (L-Ala) y L-Glu, por lo que es considera una fuente de carbono y nitrógeno (Chou et al. 2008). La vía de la arginina descarboxilasa también se ha encontrado en *E. coli* (Szumanski y Boyle 1990), *Aeromonas caviae* y *E. faecalis (*Naumoff et al. 2004) por mencionar algunas.

### 2.3.5 VÍA DE LA ARGINASA

La vía ha sido ampliamente estudiada en *Bacillus subtilis*, donde los genes que la componen están distribuidos en los operones *rocABC*, *rocDEF* y el gen *rocG*. La arginasa (RocF, EC 3.5.3.1) cataliza la conversión de L-Arg a L-Orn y urea (Figura 4). Posteriormente, la L-Orn es trasformada en L-glutamato 5-semialdehído por la ornitina aminotrasferasa (RocD, EC 2.6.1.13). Este compuesto cicla de forma espontánea, formando la 1-pirrolina-5-carboxilato, que sirve de sustrato para 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (RocA, EC 1.2.1.88), formando L-Glu. El aminoácido se convierte en 2-KG, por medio de la glutamato dehidrogenasa (RocG) (EC 1.4.1.2). Esto proporciona el potencial para que algunas bacterias utilicen la L-Arg como única fuente de carbono y nitrógeno, ya que la urea liberada es convertida en amonio por medio de la ureasa (EC: 3.5.1.5) (Lu 2006).

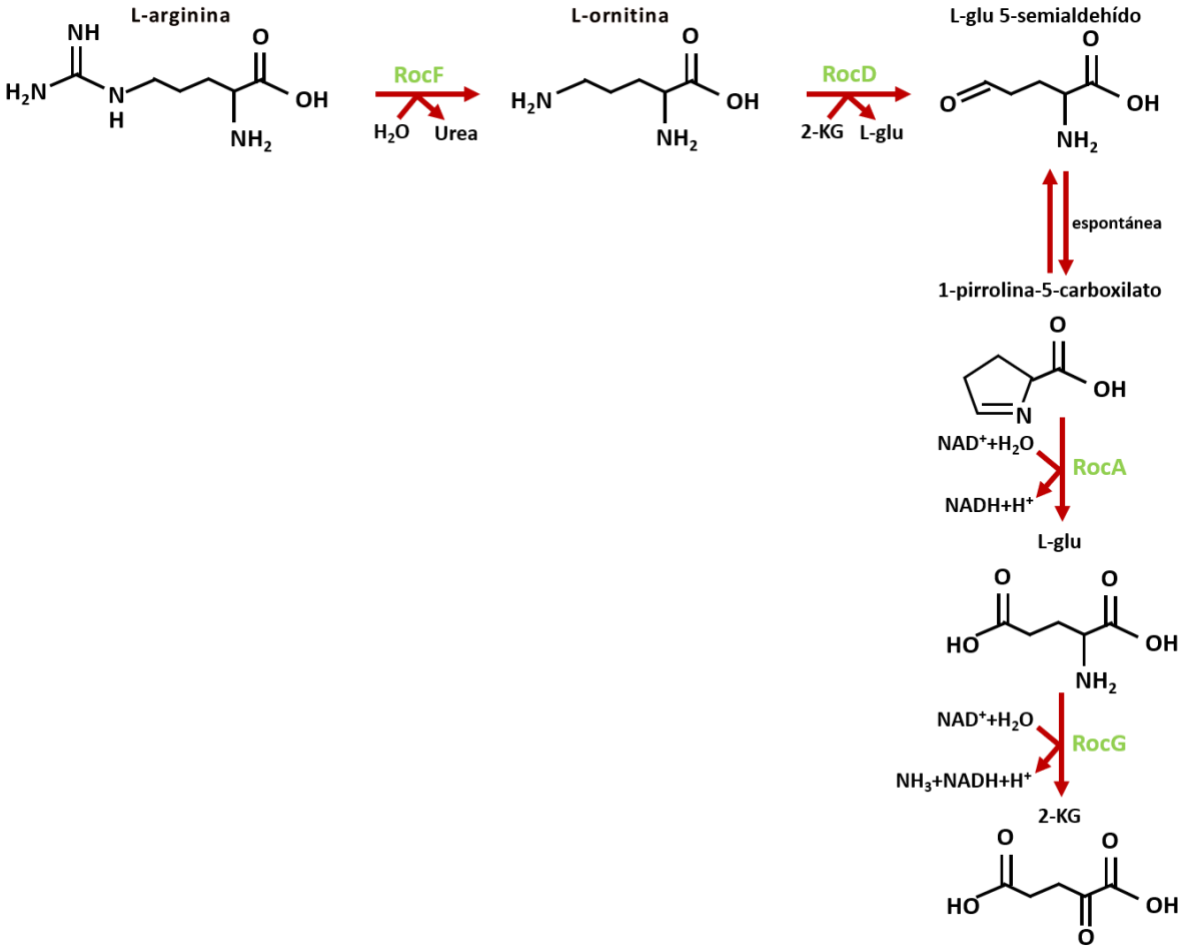


Figura 4. Ruta de la arginasa en *B. subtilis*.

## 2. 4 LA ENZIMA ARGINASA

### 2.4.1 GENERALIDADES DE LA ENZIMA

La arginasa (L-arginina amidinohidroalsa) es una enzima que pertenece a la superfamilia ureohidrolasa, la cual también incluye a la agmatinasa, forminoglutamasa (EC 3.5.3.8) y proclavaminato amidinohidrolasa (EC 3.5.3.22). La enzima como se mencionó, cataliza la hidrólisis de L-Arg para formar L-Orn y urea (Figura 4), dicha reacción necesita de un catión divalente y consiste en retirar el grupo guanidino de la L-Arg (Ash 2004). Mientras la L-Orn puede ser precursor de diversos metabolitos, la urea es una molécula relativamente pequeña,

neutra, rica en nitrógeno y muy soluble en agua. Por lo tanto, la arginasa juega un papel fundamental en el metabolismo del nitrógeno, al retirar a la urea de su molécula transportadora (Jenkinson et al. 1996).

La enzima está ampliamente distribuida en los seres vivos y se ha encontrado tanto en el dominio Bacteria como Eucaria, pero no en el Arquea. Además, se piensa que la enzima surgió en las bacterias y se transfirió a las levaduras, plantas, invertebrados y vertebrados por medio de la mitocondria (Dzik 2014). En bacterias la enzima tiene diferentes nombres dependiendo de la especie, pudiendo ser denominada como RocF en el género *Bacillus* y *Helicobacter pylori*, ArgI en *Sinorhizobium meliloti* y ArcA en *Agrobacterium tumefaciens*; mientras que en humanos es conocida como Arg2. Por otra parte, en los animales que metabolizan el exceso de nitrógeno como urea, presentan adicionalmente la isoforma 1 (Arg1) (Dizikes et al. 1986, Vockley et al. 1996; Caldwell et al. 2018).

### 2.4.2 REGULACIÓN GENÉTICA

Las bacterias responden a los cambios en su entorno modificando la actividad o cantidad de sus enzimas. En cuanto a la L-Arg se refiere, se sabe que en ausencia del aminoácido se promueve la expresión de los genes implicados en la biosíntesis, mientras que los de degradación son reprimidos. En bacterias, el regulador que controla el metabolismo de la L-Arg es denominado ArgR y para el caso específico de la arginasa, se necesita además del factor sigma L ($\sigma^L$) y de la proteína activadora de este, denominada RocR y (Figura 5).

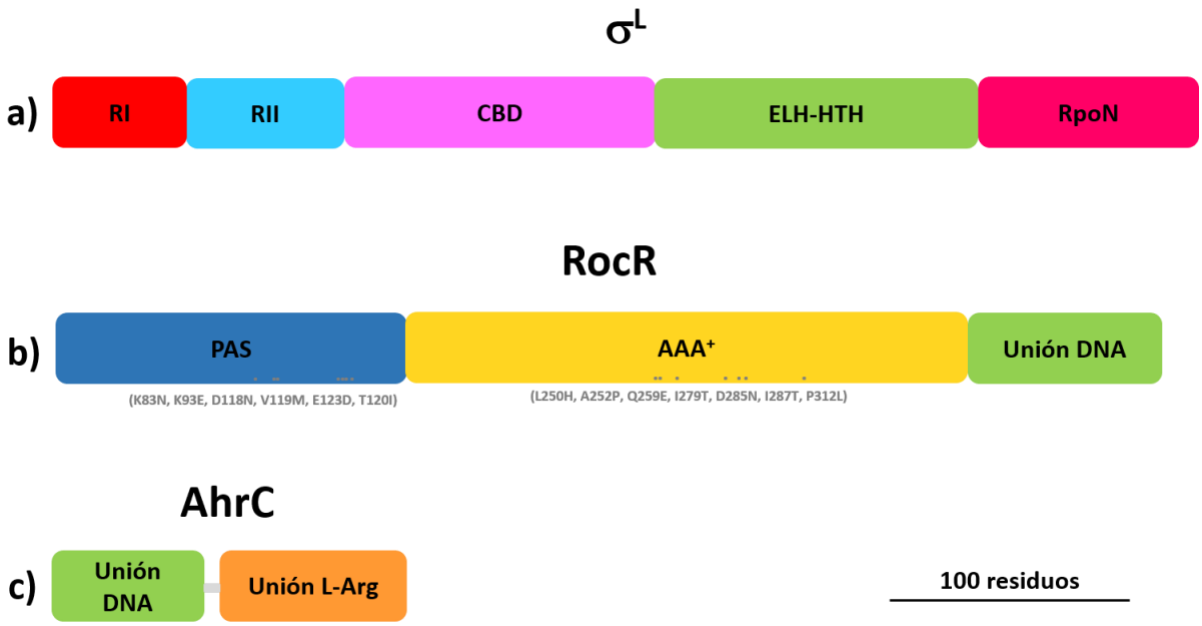


Figura 5. Esquema de la composición de dominios de los reguladores genéticos que participan en la transcripción de los genes *roc.* a) $\sigma^L$ con la región I y II en color rojo y turquesa, respectivamente; mientras que la región III está implícitamente representada por el dominio CBP, ELH-HTH y RpoN (Buck et al. 2000; Hong et al. 2009; Campbell et al. 2017; Yang et al. 2015; Glyde et al. 2017). b) RocR con cada uno de sus dominios representado por un color, y en puntos y letras en gris las mutaciones puntuales en cada una de las regiones (Bush y Dixon 2012; Gardan et al. 1995; 1997; Zaprasis et al. 2014). C) AhrC con cada uno de sus dominios representado por un color y en gris el linker que los une (Czaplewski et al. 1992; Sunnerhagen et al. 1997; Garnett et al. 2007; Park et al. 2016).

### 2.4.2.1 Factor $\sigma^L$

En *B. subtilis*, la arginasa (*rocF*) es parte del operón *rocDEF*, el cual tiene un promotor con secuecnias conservadas en las posiciones -12 y -24 río arriba del inicio de la transcripción, similar a lo observado para el operón *rocABC* (Gardan et al. 1995) y *rocG* (Belitski y Sonenshein 1999) (Figura 6). Dichas secuencias son reconocidas por la proteína SigL de 49.6 kDa ($\sigma^L$), que es homólogo del factor sigma 54 ($\sigma^{54}$) en bacterias Gram negativas y está implicado en el metabolismo del nitrógeno (Debarbouille et al. 1991).

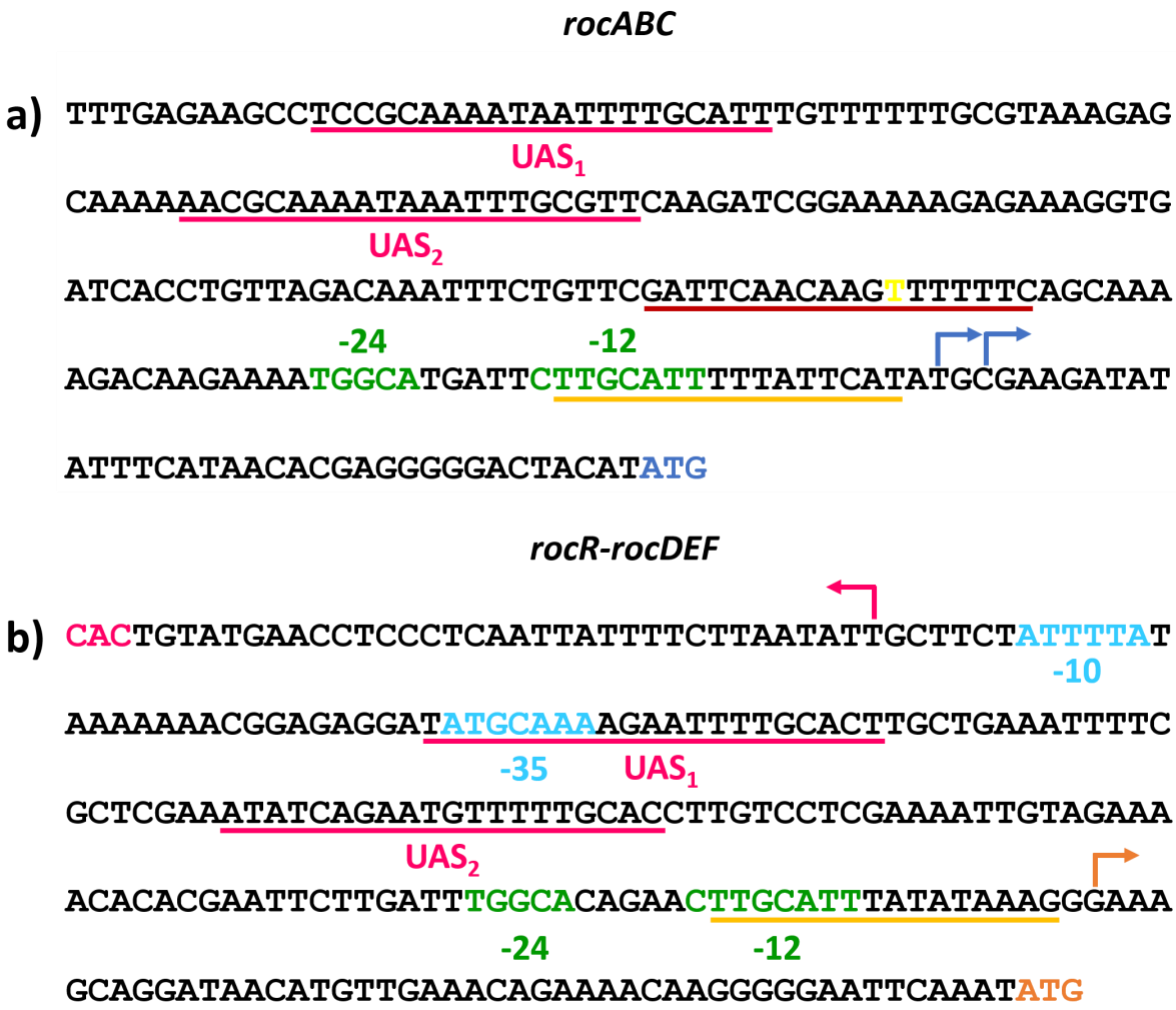


Figure 6. Secuencias intergénicas de los operones *roc*. Las líneas en color magenta indican las secuencias de unión a RocR, en amarillo a AhrC y en rojo al factor de integración al hospedero (integration host factor, IHF). Las secuencias en color verde representan los sitios de unión a $\sigma^L$, en turquesa a $\sigma^A$, en amarillo la curvatura del DNA y en azul marino, magenta y naranja el primer codón de RocA, RocR y RocD, respectivamente.

El factor $\sigma^L$ de *B. subtilis* tiene un 32 % de similitud con el factor $\sigma^{54}$ de *E. coli*, el cual a nivel estructural está dividido en tres regiones dentro de los cuales se albergan cuatro dominios (Figura 5a): *i*) la región I N-terminal (RI), que es responsable de la interacción con las proteínas activadoras de la transcripción y el elemento -12 del promotor, *ii*) la región II (RII), que interfiere con la entrada del DNA y la estabilización de la burbuja de la transcripción y *iii*) la región III (RIII),

que esta subdividida en el dominio de unión al núcleo de la RNA polimerasa (Core binding domain, CBD), el de interacción con elementos de la caja -12 del promotor (extra-long helix-helix-turn-helix, ELH-HTH) y el de interacción con elementos de la caja -24 del promotor (RpoN) (Buck et al. 2000; Hong et al. 2009; Campbell et al. 2017; Yang et al. 2015).

Una cepa mutante en el gen que codifica para este factor sigma, mostró efectos pleiotrópicos, ya que la bacteria no puede crecer en medio mínimo utilizando L-Arg, L-Orn, L-Iso o L-Val como fuente de nitrógeno (Debarbouille et al. 1991). En *Bacillus thuringiensis* $\sigma^L$ regula 47 genes, que están agrupados en 16 operones y dentro de los cuales está el operón *roc*, lo cual fue determinado por medio del análisis de los datos de microarreglos y funcionales de una cepa mutante (Peng et al. 2015).

#### 2.4.2.2 RocR

En contraste al inicio de la transcripción mediada por el factor $\sigma^{70}$, $\sigma^L$ requiere de la presencia de un activador, que acople la energía generada por la hidrólisis del ATP para la formación del complejo abierto RNA polimerasa-$\sigma^L$ (RNAP-$\sigma^L$) (Schumacher et al. 2004). Tales activadores son denominados de forma genérica como proteínas bacterianas de unión al potenciador (bacterial enhancer-binding protein, bEBP) y reconocen secuencias específicas ubicadas río arriba del inicio de la transcripción (upstream activating sequence, UAS), que típicamente se encuentran entre -80 y -150 pb del promotor (Joly et al. 2012; Bush y Dixon 2012). Debido a su similitud en estructura y función, estas proteínas son clasificadas como miembros de la superfamilia de proteínas ATPasas asociadas con varias actividades celulares (ATPase associated with diverse range of cellular activities, $AAA^+$) (Neuwald et al. 1999), dentro de las cuales se encuentra RocR.

La proteína RocR tiene un peso de 52 kDa y posee tres dominios: *i*) en el extremo N-terminal, el dominio sensor del tipo Per-Arnt-Sim (PAS) que percibe alguna señal y modula la actividad del domino central, *ii*) el dominio central, que contiene los determinantes de la superfamilia $AAA^+$, que hidroliza el ATP y activa la formación del complejo abierto, y *iii*) el dominio de unión al DNA, ubicado en el extremo C-terminal que consta de un motivo HTH, que especifica el reconocimiento de la UAS (Figura 5b) (Bush y Dixon 2012; Joly et al. 2012).

El dominio PAS (residuos del 1 al 146) reprime la actividad del dominio central en la ausencia de L-Orn y aunque el mecanismo no ha sido estudiado en esta proteína, con base en otros activadores se sabe que puede impedir su oligomerización, la actividad ATPasa o interactuar con el factor $\sigma^L$. En presencia de L-Orn la proteína sufre un cambio conformacional permitiendo al dominio central ejercer su función (Bush y Dixon 2012; Gardan et al. 1995; 1997). La deleción del dominio N-terminal en RocR promueve la expresión constitutiva de los operones *roc* (Gardan et al. 1997). Las mutaciones puntuales de los residuos K83N, K93E, D118N, V119M, E123D y T120I (Figura 5b), así como la deleción parcial (Δ5-107 y Δ 5-121) en el dominio (Figura 5b), resultan en la expresión de los genes *roc* sin la necesidad de la molécula efectora (Gardan et al. 1997; Zaprasis et al. 2014).

El dominio $AAA^+$ (residuos del 147 al 380) es responsable de unir e hidrolizar al nucleótido, oligomerizar y contactar al $\sigma^L$ para activar al $\sigma^L$-$RNA_{pol}$ (Osuna et al. 1997, Bush y Dixon 2012; Joly et al. 2012). Las mutaciones puntuales de los residuos L250H, A252P, Q259E, I279T, D285N, I287T y P312L (Figura 5b), resultan en la expresión de los genes *roc* sin la necesidad de la molécula efectora, de forma similar a las mutaciones en el domino PAS (Gardan et al. 1997; Zaprasis et al. 2014).

El dominio C-terminal (residuos del 381 al 461) reconoce dos UASs tanto en el operón *rocABC* como en el *rocDEF,* las cuales son muy similares (Figura 6) (Cologero et al. 1994; Gardan et al. 1995). La deleción del $UAS_1$ en el operón *rocDEF* reduce dramáticamente su expresión con base en ensayos de actividad de β-galactosidasa, lo cual sugiere que tal vez la $UAS_1$ es la más importante (Gardan et al. 1995) o que tanto $UAS_1$ y $UAS_2$ son necesarias para un reconocimiento eficiente de la región de DNA por el domino. A falta de una fusión transcripcional con la deleción de $UAS_2$ esto no puede ser discernido. Este dominio tiene la capacidad de realizar cuatro funciones en RocR: *i*) unir directamente el activador al DNA objetivo para asegurar una respuesta específica, *ii*) facilitar la formación de hexámeros, *iii*) estabilizar el hexámero y iv) mantener la fidelidad regulatoria del dominio N-terminal (Bush y Dixon 2012).

Una cepa mutante en el gen *rocR* es incapaz de crecer en medio mínimo utilizando L-Arg como fuente de nitrógeno (Calogero et al. 1994). Es preciso mencionar que *rocR* muestra un promotor situado a -10 y -35 río arriba del inicio de la transcripción, bajo el control del factor $\sigma^A$ y es divergente al operón *rocDEF*. Este promotor traslapa con la $USA_1$ del operón, por lo que RocR regula de forma negativa su expresión cuando se une a la L-Orn (Figura 6b) (Gardan et al. 1997).

#### 2.4.2.3 AhrC

En muchas bacterias la concentración de L-Arg es controlada por la familia de reguladores ArgR/AhrC. El regulador reprime la expresión de los genes involucrados en la biosíntesis durante altas concentraciones del aminoácido y activa los genes involucrados en el catabolismo (Maghnouj et al. 1998; Lu et al. 1992). A nivel estructural el regulador tiene un dominio N-terminal de unión a DNA (residuos del 1 al 64) con un motivo HTH y un C-terminal responsable de la oligomerización y unión a la L-Arg (residuos del 71 al 149) (Figura 5c) (Czaplewski et al.

1992; Sunnerhagen et al. 1997; Garnett et al. 2007; Park et al. 2016). Cada monómero se ensambla en complejos triméricos o hexaméricos en ausencia o presencia del aminoácido (Dennis et al. 2002; Ghochikyan et al. 2002). Los hexámeros se unen al DNA mediante su N-terminal, por el reconocimiento de secuencias palindrómicas ligeramente imperfectas (cajas ARG) localizadas río arriba del inicio de la transcripción (Miller et al. 1997; Rodríguez-García et al. 1997). En *B. subtilis* se ha comprobado *in vitro* por medio de ensayos de cambio en la movilidad electroforética que los operones *roc* contienen las secuencias de unión a AhrC (cajas ARG), las cuales traslapan con la región promotora reconocida por $\sigma^L$ (-10) (Klingel et al. 1995; Miller et al. 1997). Posteriormente, se demostró por medio de ensayos de actividad de β-galactosidasa en fusiones transcripcionales sin la caja ARG del operón *rocDEF*, que AhrC aun activa su expresión. Por otra parte, una cepa mutante en el gen *ahrC* es incapaz de activar la transcripción de dicho operón. Aunque el mecanismo preciso de cómo AhrC activa la transcripción de los operones *roc* es desconocido, se ha propuesto que tal vez sea por medio de la interacción proteína-proteína con RocR (Gardan et al. 1997).

#### 2.4.2.4 REGULACIÓN POR Lrp

En el dominio Bacteria y Arquea existen reguladores globales de la transcripción como las proteínas reguladoras de respuesta a L-leucina (Leucine-responsive regulatory protein, Lrp), las cuales están involucradas en el control de la expresión de diversos genes implicados en distintos procesos celulares. Los reguladores Lrp, podrían complementar o suplir la ausencia de AhrC/ArgR en el metabolismo de la L-Arg, como sucede *en E. coli*, donde el gen *argA*, es regulado tanto por ArgR como Lrp (Cho et al. 2012). Estas proteínas forman una familia de reguladores que se unen al DNA y controlan la transcripción de genes involucrados en procesos celulares

como síntesis, degradación y transporte de aminoácidos; expresión de porinas y formación de pilus (Newman et al. 1992; Calvo y Matthews 1994; Newman y Lin 1995; Jafri et al. 1999; Brinkman et al. 2003).

En *E. coli,* una proteína de la familia de las Lrp regula de forma negativa el 70 % de los 215 genes que se expresan en fase estacionaria (Tani et al. 2002). Esta proteína tiene un tamaño de 163 aminoácidos y un peso de 18.8 kDa, la cual puede formar dímeros, tetrámeros, octámeros o hexadecámeros (Chen y Calvo 2002). A nivel estructural, la proteína está formada por: *i*) el dominio N-terminal de unión a DNA con un motivo HTH, que reconoce las secuencias ricas en A y T, ubicadas río arriba del promotor (Figura 7); *ii*) el péptido interdominio que participa en la formación de los dímeros y *iii*) el dominio C-terminal, que es homólogo al dominio de regulación del metabolismo de aminoácidos (RAM) y cuya función es albergar los sitios de unión a la molécula efectora (L-leucina) y participar en la formación de diferentes oligómeros. En presencia de leucina el domino RAM favorece la formación de octámeros, los cuales pueden unirse al DNA por medio del motivo HTH (de los Rios et al. 2007).

Estudios previos indican que homólogos de Lrp tienen un papel de regulación más específico en el metabolismo y transporte de distintos aminoácidos (Brinkman et al 2003; Lemmens et al. 2019). Por ejemplo, en *Agrobacterium* y *Rhodobacter capsulatus,* el gen *putA* que codifica para una prolina deshidrogenasa (EC 1.5.5.2), es esencial para la utilización de L-prolina (L-Pro) y es regulado de forma positiva por la proteína PutR, la cual es activada por L-Pro (Keuntje et al. 1999; Cho y Winans 1996; Jafri et al. 1999). En *Pseudomonas,* el operón *bkdAB* está involucrado en la degradación de aminoácidos de cadena ramificada y es regulado positivamente por BkdR en presencia de aminoácidos como L-Val o L-Iso (Madhusudnan et al. 1993). En *E. coli* el gen

*asnA*, que codifica para una asparagina sintetasa (EC 6.3.5.4) es regulado por AsnC, el cual en presencia de L-asparagina (L-Asp) reprime su expresión (Kólling et al. 1985). Estos trabajos han llegado a la conclusión de que los reguladores tipo Lrp regulan positivamente o negativamente los genes que codifican para enzimas en las vías de biosíntesis, degradación y transporte de aminoácidos (Brinkman et al. 2003; Lemmens et al. 2019).

| | | |
|---|---|---|
| ***E. coli*** | **Lrp** | **–TAGCAAATTTTGCTG–** |
| ***Pyrococcus furiosus*** | **LrpA** | **TATACCTAGGTGGTTCG** |
| ***Pyrococcus horikoshii*** | **LrpA** | **TATACTTAGGTGGTTTG** |
| ***Pyrococcus abyssi*** | **LrpA** | **TATACCTAGGTGGTTTC** |
| ***Methanocaldococcus jannaschii*** | **Ptr2** | **–GGACGATTTTCGTCC–** |
| ***Methanocaldococcus jannaschii*** | **Ptr1** | **––TACGCATTGCGTA––** |
| ***Sulfolobus solfataricus*** | **LysM** | **GGTTCTAAAATCGTACC** |
| ***Sulfolobus tokodai*** | **LysM** | **GGTACTAATTTCGAACC** |
| ***Sulfolobus acidocaldarius*** | **LysM** | **GGTTTTAAAATCGAACC** |
| ***Aeropyrum pernix*** | **LysM** | **GGTTCGAAATAGGAACC** |

Figura 7. Secuencias de DNA reconocidas por proteínas tipo Lrp. En color rojo se muestran las bases clave para la unión del regulador (tomado y modificado de Brinkman et al. 2003).

### 2.4.3 PROPIEDADES ESTRUCTURALES

Existen 11 estructuras cristalográficas de las arginasas de bacterias en la base de datos de proteínas (Protein data bank, PDB), que corresponden a seis especies: *B. caldovelox*, *H. pylori, Bacillus cereus, B. subtilis, Zymomonas mobilis* y *Thermus thermophilus*, de las cuales únicamente dos cuentan con una descripción detallada de sus características (Bewley et al. 1999; Zhang et al. 2012; Chang et al. 2018; Hwangbo et al. 2019).

### 2.4.3.1 LOS MONÓMEROS Y LA OLIGOMERIZACIÓN

Las subunidades de la arginasa están formadas por ocho laminas β paralelas, flanqueadas por cuatro α-hélices de un lado (B, C, D y E) y cuatro por el otro (A, F, G y H), lo que da como resultado un plegamiento del tipo α/β (Figura 8). Es importante mencionar que cada monómero de la arginasa tiene dos átomos de metal divalente en el sito activo, los cuales son esenciales durante la catálisis (Bewley et al. 1999; Zhang et al. 2012; Hwangbo et al. 2019).

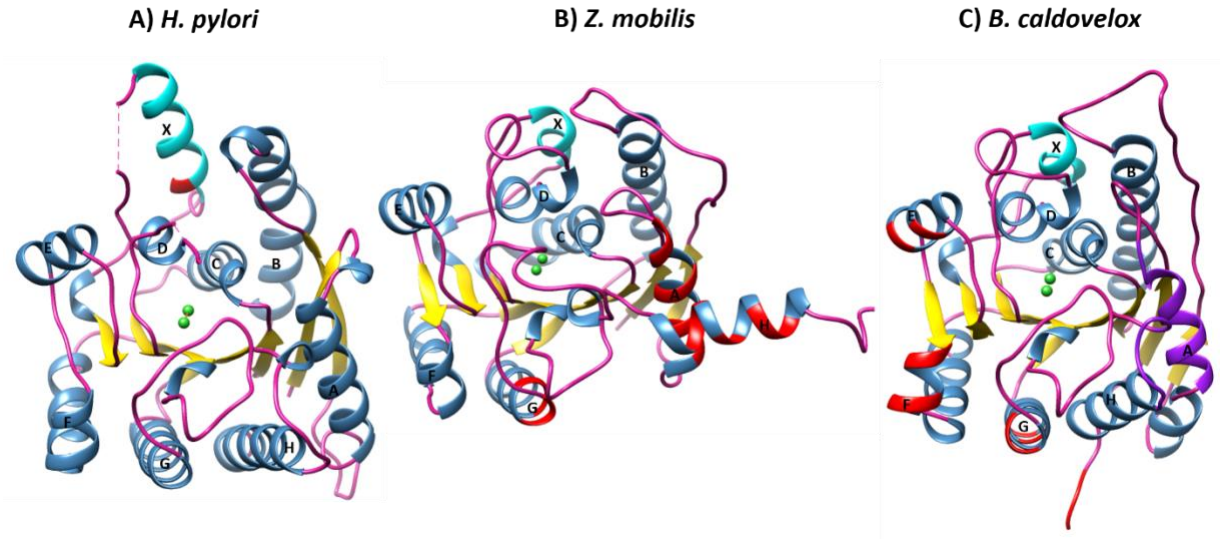


**Figura 8.** Estructura secundaria de los monómeros de tres arginasas bacterianas. En color azul se muestran las α-hélices, excepto la X que está en turquesa, en amarillo las láminas β, en magenta los loops (bucles) y en verde los átomos de metal. Los fragmentos en color rojo o morado corresponden a los residuos involucrados en la formación de dímeros, trímeros o hexámeros, según sea el caso (modificado de Bewley et al. 1999; Zhang et al. 2012; Hwangbo et al. 2019).

En *Z. mobilis*, la arginasa forma dímeros por medio de algunos residuos encontrados en la αA, G y H, estando la última orientada hacia el exterior y difiriendo de la enzima de *H. pylori* y *B. caldovelox* (Figura 8B y 9B) (Hwangbo et al. 2019). Por su parte, la arginasa de *H. pylori*, existe principalmente como monómeros (Zhang et al. 2013) y tiene una inserción de 13 residuos

($^{153}$ESEEKAWQKLCSL$^{165}$), que pliegan en una $\alpha$-hélice que denominamos X, la cual está presente en sus ortólogos, pero con menor tamaño (Figura 8A y 9A) (Zhang et al. 2012).

Por medio de la mutación puntual de cada uno de los residuos que forman la $\alpha$X por Ala, se determinó que el Glu155 y Trp159 son esenciales en la actividad de la enzima, ya que su cambio resulta en una enzima catalíticamente inactiva y menos estable. El primero está implicado en la conformación del sitio activo, mientras que el segundo en la retención de alguno de los átomos de metal. El Glu156, Gln160 modulan de forma positiva la actividad de la enzima, debido a que están implicados en mantener la afinidad aparente del sustrato ($K_{0.5}$) y el número de recambio ($k_{cat}$), ya que su cambio por Ala aumenta la $K_{0.5}$ y disminuyen la $k_{cat}$. Por otra parte, la Cys163 mantiene la $k_{cat}$, ya que está implicada en la formación de los dímeros, los cuales son más activos que los monómeros. Además, el Glu156 y Gln160 también están implicados en mantener la estabilidad de la enzima. El residuo de Lys161 modula de forma negativa la actividad enzimática al aumentar la $K_{0.5}$ y disminuir la $k_{cat,}$ pero mantiene la estabilidad de la proteína (Srivastava et al. 2013). Por último, la arginasa de *B. caldovelox* forma hexámeros, los cuales son resultado de la unión de dos trímeros. Los trímeros son formados por medio de algunos residuos presentes $\alpha$E, F y G, mientras que los hexámeros por los de $\alpha$A y el loop que precede a $\alpha$H (Figura 8C, 9C y D) (Bewley et al. 1999). La mutación de Glu278 por Ala inhibe la interacción con Arg277 de otra subunidad, lo que a su vez inhibe la formación de los hexámeros. Esta variante de la enzima demostró que no es necesaria la formación de los hexámeros para la actividad, ya que los trímeros fueron activos, aunque con una $K_m$ mayor (García et al. 2015).

### 2.4.3.2 EL SITIO ACTIVO

La cavidad del sitio activo es creada por residuos que incluye los tres motivos característicos de las arginasas (GGDHS, DAHXD y SXDXDXXDP), pero que en bacterias no es totalmente conservado.

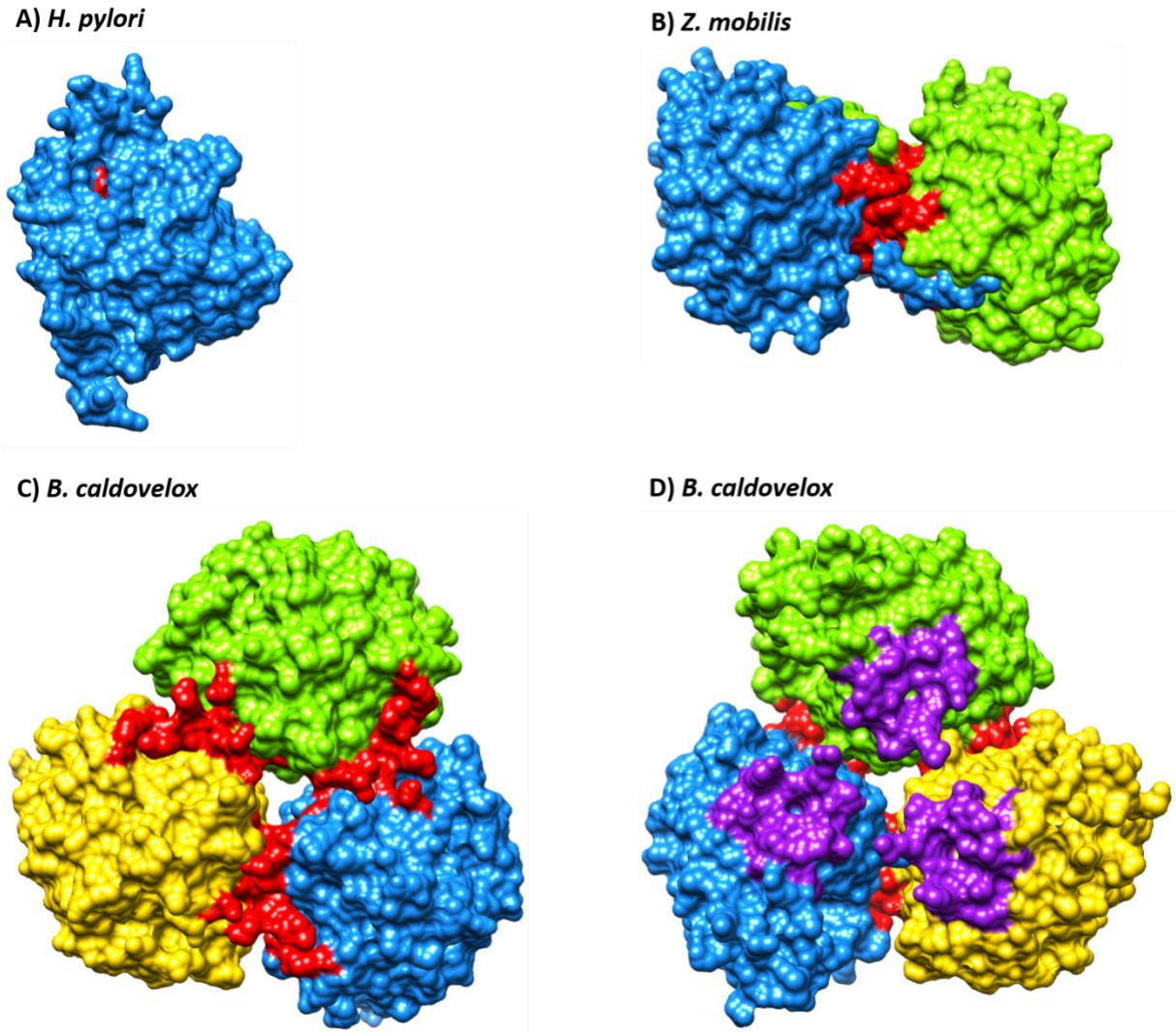


Figura 9. Estados oligomericos reportados para las arginasas bacterianas. El color azul, verde y amarillo representan un monómero. El color rojo indica los residuos que participan en la

formación de dímeros o trímeros, mientras que el morado los que participan en la formación de los hexámeros (Bewley et al. 1999; Zhang et al. 2012; Hwangbo et al. 2019).

En *B. caldovelox* el primer motivo está formado por los residuos $^{96}$GGDHS$^{100}$, donde la Gly96 y Gly97 forman un enlace peptídico en *cis*, lo que desencadena de forma indirecta en la ubicación adecuada de His99 para coordinar a $Mn_A^{2+}$ (Figura 10A) (Bewley et al. 1999). En *H. pylori* el motivo está formado por $^{88}$SSEHA$^{92}$, donde el único residuo conservado es el de His91, cuya función es mantener la estabilidad y la actividad enzimática, ya que su mutación por Ala reduce la eficiencia catalítica probablemente debido a la pérdida de un átomo de metal (Srivastava et al. 2011; Zhang et al. 2013). El mecanismo preciso por el cual el residuo mantiene el centro binuclear intacto no es claro, ya que la estructura reportada para la enzima no muestra un enlace de coordinación con alguno de los metales (Figura 10C) (Zhang et al. 2012). La Ser88 y Ser89 forman un enlace péptido en *cis* de forma similar al de Gly96 y Gly97 en la arginasa de *B. caldovelox*, por lo que podrían estar involucradas en la ubicación de la His91. Cuando los residuos del motivo son mutados de manera individual para obtener sus respectivos análogos en otras arginasas, se observó que la Ser88 y Ala92 modulan de forma negativa la actividad enzimática, mientras que Ser89 y Glu90 la modulan de forma positiva. Además, también se determinó que los residuos de Ser88 y Glu90 están involucrados en mantener la estabilidad de la enzima (Srivastava et al. 2011). En *Z. mobilis* el motivo tampoco es totalmente conservado, ya que está compuesto por los residuos $^{89}$GGDCL$^{93}$, donde la Cys92 coordina al $Zn_A^{2+}$ de forma similar a la His presente en el motivo de las otras arginasas (Figura 10B) (Hwangbo et al. 2019).

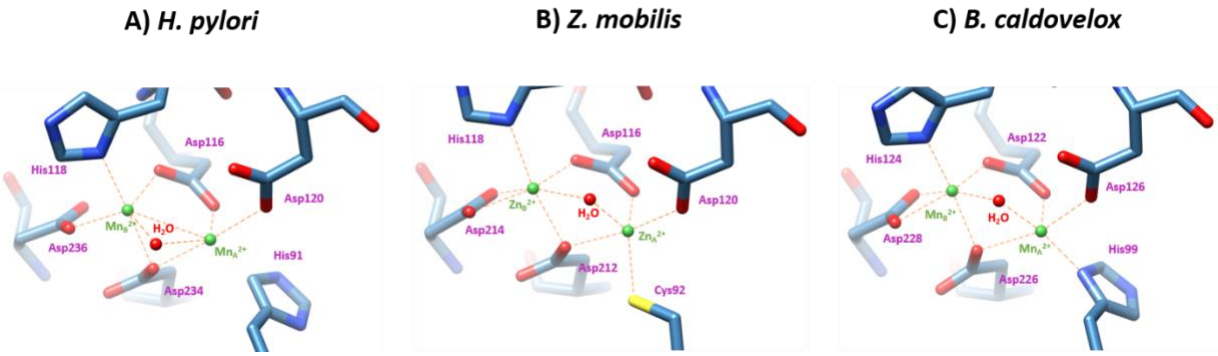


**Figura 10.** Centro binuclear de tres arginasas bacterianas (modificado de Bewley et al. 1999; Zhang et al. 2012; Hwangbo et al. 2019).

El segundo motivo es conservado en las tres estructuras y en *B. caldovelox* está formado por $^{122}$DAHGD$^{126}$, con el Asp122 participando en la coordinación de ambos átomos de metal, mientras que la His124 y Asp126 únicamente se enlazan con el $Mn_B^{2+}$ y $Mn_A^{2+}$, respectivamente (Bewley et al. 1999). En *Z. mobilis* el motivo está parcialmente reemplazado ($^{116}$DSHAD$^{120}$), donde la S117 cambia en lugar de una Ala. En *H. pylori* se ha de mostrado que el cambio de Asp116, His118 y Asp120 por una Ala, trae como resultado la pérdida de la actividad enzimática (Zhang et al. 2013). Para el caso específico de la Asp116 se sabe que a pesar de que coordina ambos átomos de metal, su cambio por Ala no representa la pérdida de alguno (Srivastava et al. 2011).

Por último, en el tercer motivo en *B. caldovelox* ($^{224}$SLDLDGLP$^{231}$), la Asp226 coordina a los dos átomos de metal y Asp228 coordina dos veces a $Mn_B^{2+}$ (Bewley et al. 1999). *En Z. mobilis* el resido de Ser224 está reemplazado por una His, pero no altera la formación del centro binuclear, mientras que en *H. pylori* a pesar de mostrar los residuos conservados, la Asp236 únicamente forma un enlace de coordinación en vez de dos con el $Mn_B^{2+}$ (Zhang et al. 2012;

Hwangbo et al. 2019). La mutación puntual de Asp234 y Asp236 por Ala, trae como consecuencia la pérdida de la actividad enzimática (Zhang et al. 2013).

### 2.4.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

#### 2.4.3.1 CATIÓN METÁLICO DIVALENTE

Las arginasas estudiadas tanto de origen procarionte como eucarionte requieren de dos átomos de metal divalente por monómero para mostrar su máxima actividad específica, los cuales conforman un centro binuclear y cuya función es la deprotonación de una molécula de agua que actúa como nucleófilo catalítico (Reczkowski y Ash 1992). El $Mn^{2+}$ es el activador fisiológico más común, sin embargo, algunas prefieren otros iones como el $Ni^{2+}$, $Co^{2+}$ y $Cd^{2+}$ (McGee et al. 2004; Nakamura et al. 1973; Viator et al. 2008) (Tabla 1). Por otra parte, a pesar de que la mayoría de las arginasas tiene preferencia por algún metal, pueden utilizar más de uno, pero su actividad disminuye, como sucede con la arginasa de *B. caldovelox* y *Entamoeba histolytica*, las cuales puede usar hasta 8 y 7 diferentes metales divalentes, con una actividad mayor al 50 %, respecto al $Mn^{2+}$ (Song et al. 2014; Malik et al. 2018). Lo anterior difiere de la arginasa de rata, la cual únicamente funciona con $Mn^{2+}$. Hasta el momento se desconoce por que la arginasa de *B. subtilis* utiliza $Cd^{2+}$ como catión preferencial, puesto que dicho metal es toxico para la mayoría de las bacterias. El metal también protege a la enzima contra la inactivación por altas temperaturas y potentes inhibidores como el fosfato, agentes sulfhidrilo y *N*-bromosuccinimida (NBS) (Surowitz et al. 1984).

### 2.4.3.2 pH

En general las arginasas tanto de eucariontes como procariontes muestran su máxima actividad en pHs alcalinos (Tabla 1). En bacterias, el rango va de 8.0 a 11.0, mientras que en invertebrados, plantas, animales y humanos varía entre 9.4 a 10.5. (Jenkinson, 1996). Una excepción se presenta con la arginasa de *H. pylori,* que prefiere un pH ácido (McGee et al. 2004; Mendz et al. 1998; Srivastava et al. 2010; Zhang et al. 2011; 2013). Bajo condiciones alcalinas se proveen valores de pK de la enzima entre 7.8 y 8.0 en rata y humano, respectivamente (Kuhn et al. 1991; 1995) y son consistentes con el pK esperado para la ionización del solvente, formando un puente con el centro binuclear, resultando en la formación de un ion $HO^-$, que funciona como nucleófilo catalítico (Sossong et al. 1997) (Figura 11).

### 2.4.3.3 SUSTRATO

La especificidad del sustrato de las arginasas depende de: *i*) la presencia de un grupo guanidino intacto, *ii*) longitud apropiada e hidrofobicidad de la cadena lateral y *iii*) estereoquímica y naturaleza de los sustituyentes en el Cα. La actividad de los análogos de L-Arg depende en gran medida de las modificaciones en el Cα. Por ejemplo, D-Arg, guanidinobutirato, L-arginamida, L-ácido arginínico y Agm no son sustratos para la enzima. A pesar de que la enzima puede utilizar como sustrato a la L-canavanina y L-argininamida, sus $k_{cats}$ son de 15 a 5000 veces más lenta comparada con la L-Arg (Reczkowski y Ash 1994). Tal sutileza en la especificad del sustrato sugiere una constelación bien definida de donadores de puentes de hidrógeno presentes en el sitio activo (Ash 2004).

**Tabla 1.** Características bioquímicas de las arginasas bacterianas analizadas experimentalmente.

| Especie | Cepa | PM (kDa) | Oligómero | $K_{mArg}$ (mM) | pH | Temperatura (°C) | Metal | Inhibidores | Referencia |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *A. tumefaciens* | C58 | 35 | Hexámero | 20-40 | 8.3-8.7 | 35-39 | $Mn^{2+}$ | Agm<br>L-Orn<br>Put<br>Cad | Sans et al. 1987<br>Schrell et al. 1989 |
| *Bacillus anthracis* | C12R y C14R | | | 2.9 | 9.8-10 | | $Mn^{2+}$ | L-Asp<br>L-Trp<br>L-Orn<br>L-Glu | Soru 1983 |
| | 7702 | 34.6 | | 10 | 9.0 | | $Ni^{2+}$ | | Viator et al. 2008 |
| *Brucella abortus* | | 33* | | | 8.5 | 30 | $Mn^{2+}$ | | Kim y Mayfiel 1997 |
| *B. brevis* | Nagano | 32 | Hexámero | 12.8 | 10.0 | | $Mn^{2+}$ | L-Orn | Kanda et al. 1997 |
| | TT02-8 | 33 | Tetrámero | 0.69 | 11.0 | 77 | $Mn^{2+}$ | L-Lys<br>L-Orn | Shimotohno et al. 1994 |
| *B. caldovelox* | DSM411 | 31-32.4 | Hexámero | 3.4-3.5 | 9.0-9.5 | 60 | $Mn^{2+}$ | L-Orn | Bewley et al. 1996<br>García et al. 2015<br>Patchett et al. 1991<br>Song et al. 2014 |
| *B. licheniformis* | A-5 | | | 2.17 | 9.5-10.5 | | $Mn^{2+}$ | | Ramaley y Bernlohr 1966 |
| *B. subtilis* | 168 | 32.15-32.3 | | 4.6 | 8.4 | 45 | $Mn^{2+}$ | | Yu et al. 2013 |
| | KY3281 | | | 13.5 | 10 | | $Cd^{2+}$ | L-Lys | Nakamura et al. 1973 |
| *B. thuringiensis* | SK20.001 | 33 | Hexámero | 15.2 | 10.0 | 40 | $Mn^{2+}$ | | Zhang et al. 2013 |
| *Geobacillus thermodenitrificans* | NG80-2 | 32.2-32.3 | | 171.9 | 9.0 | 80 | $Mn^{2+}$ | | Huang et al. 2015 |
| *H. pylori* | 43504 | 37 | | 21.8 | 6.1 | 30 | $Co^{2+}$ | | McGee et al. 2004 |
| | 26695 | 36.2-38.2 | Monómeros | 8.4 | 6-8.5 | | $Co^{2+}$ | | Srivastava et al. 2010<br>Zhang et al. 2011 |
| *R. capsulatus* | E1F1 | 31 | Tetrámero | 16 | 9.0 | 35 | $Mn^{2+}$ | | Moreno-Vivián et al. 1992 |
| *Sulfobacillus acidophilus* | AMDSBA3 | 32.2 | Hexámero | 34.4 | 7.5 | 70 | $Mn^{2+}$ | L-Orn | Huang et al. 2020 |
| *Z. mobilis* | ZM4 | 32.1 | Dímero | 6.8 | | | $Mn^{2+}$ | | Hwangbo et al. 2019 |

*calculado.

## 2.4.4 MECANISMO CATALÍTICO

Tres mecanismos propuestos para la catálisis de la enzima basados en las estructuras cristalográficas, resonancia electrónica paramagnética, cinética enzimática, mutagénesis sitio dirigidas y estudios de dinámica y mecánica molecular resultados experimentales de la arginasa de rata y humano, los cuales difieren en el estado protonado del grupo guanidino del sustrato, la presencia de un ion hidróxido o molécula de agua coordinada por los dos cationes divalentes actuando como nucleófilo y la función de los residuos de His141 y Asp128 (Kanyo et al. 1996; Khangulov et al. 1998; Costanzo et al. 2005).

La propuesta realizada por Kanyo et al. (1996) en la arginasa 1 de rata es la más aceptada y recientemente apoyada por los resultados de dinámica y mecánica molecular (Velázquez-Libera et al. 2020), siendo válida tanto para la arginasa 1 de humano como la de *B. caldovelox*. El mecanismo comienza con la formación del anión hidróxido por la deprotonación de una molécula de agua por los iones $Mn^{2+}$ en el centro bimetálico, los cuales también cumplen con la función de ubicar correctamente a ion en conjunto la Asp128, con el que el hidróxido forma un puente de hidrogeno (Figura 11). En este mismo paso, la molécula de L-Arg se une a la enzima por medio de puentes de hidrógeno formados entre el grupo carboxilo de la Glu277 y Asp128, y el grupo guanidino y el nitrógeno épsilon (N$\boldsymbol{\varepsilon}$) del sustrato, respectivamente. Esto coloca al grupo guanidina y los grupos imidazol de la His141 en orientaciones paralelas, donde la interacción entre Thr246 e His141 y el sustrato son importante para mantener en la orientación correcta. El par de electrones del anión hidróxido realiza un ataque nucleofílico en el átomo de carbono zeta (C$\boldsymbol{\zeta}$) del grupo guanidino cargado positivamente de la L-Arg, que actúa como un electrófilo, generando un intermedio tetraédrico. En el segundo paso, el puente de hidrógeno

entre N**ε** y el grupo carboxilo de Asp128 se rompe por la inversión del átomo de hidrógeno, orientándose al grupo imidazol de la His141. El tercer paso se transfiere un protón del nucleófilo al grupo carboxilo de la Asp128 (3a), que posteriormente es trasferido al N**ε** de la L-Orn (3b), colapsando el intermedio tetraédrico. El cuarto paso se libera la L-Orn por la ruptura del enlace entre el N**ε** y C**ζ**. En el quinto paso se transfiere un protón del solvente al N**ε** de la L-Orn por medio de la His141, antes de su liberación, facilitada por la entrada de una molécula al centro bimetálico, que dará origen al anión hidróxido para empezar nuevamente el proceso de catálisis (Christianson et al.2005; Dowling et al.2008; Hernández et al. 2021; Velázquez-Libera et al. 2020).

## 2.5 FIJACIÓN DE NITRÓGENO

El nitrógeno es un componente esencial de los aminoácidos (proteínas), los ácidos nucleicos (DNA y RNA), el adenosin trifosfato (ATP) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) en todas las células vivas (Burén y Rubio 2018). A pesar de que el elemento es el principal componente de la atmósfera (78.08 %), en forma gaseosa ($N_2$) no puede ser utilizado, debido a la incapacidad enzimática de la mayoría de los seres vivos para romper el triple enlace y transformarlo en una forma asimilable ($NO_x$ o $NH_4^+$). La principal fuente natural de entrada de nitrógeno a la biosfera es por medio de la fijación biológica (BNF), la cual consiste en reducir el nitrógeno atmosférico ($N_2$) a amonio ($NH_3$), por medio de la nitrogenasa (EC 1.18.6.1; EC 1.19.6.1) en diazótrofos. Estos microorganismos pueden realizar dicho proceso en vida libre (*Azotobacter*, *Azospirillum*, etc.) o estableciendo relaciones simbióticas (leguminosa-rizobia, *Azolla*-cianobacterias, no leguminosa-*Frankia*) (Chaulagain y Frugoli 2021).

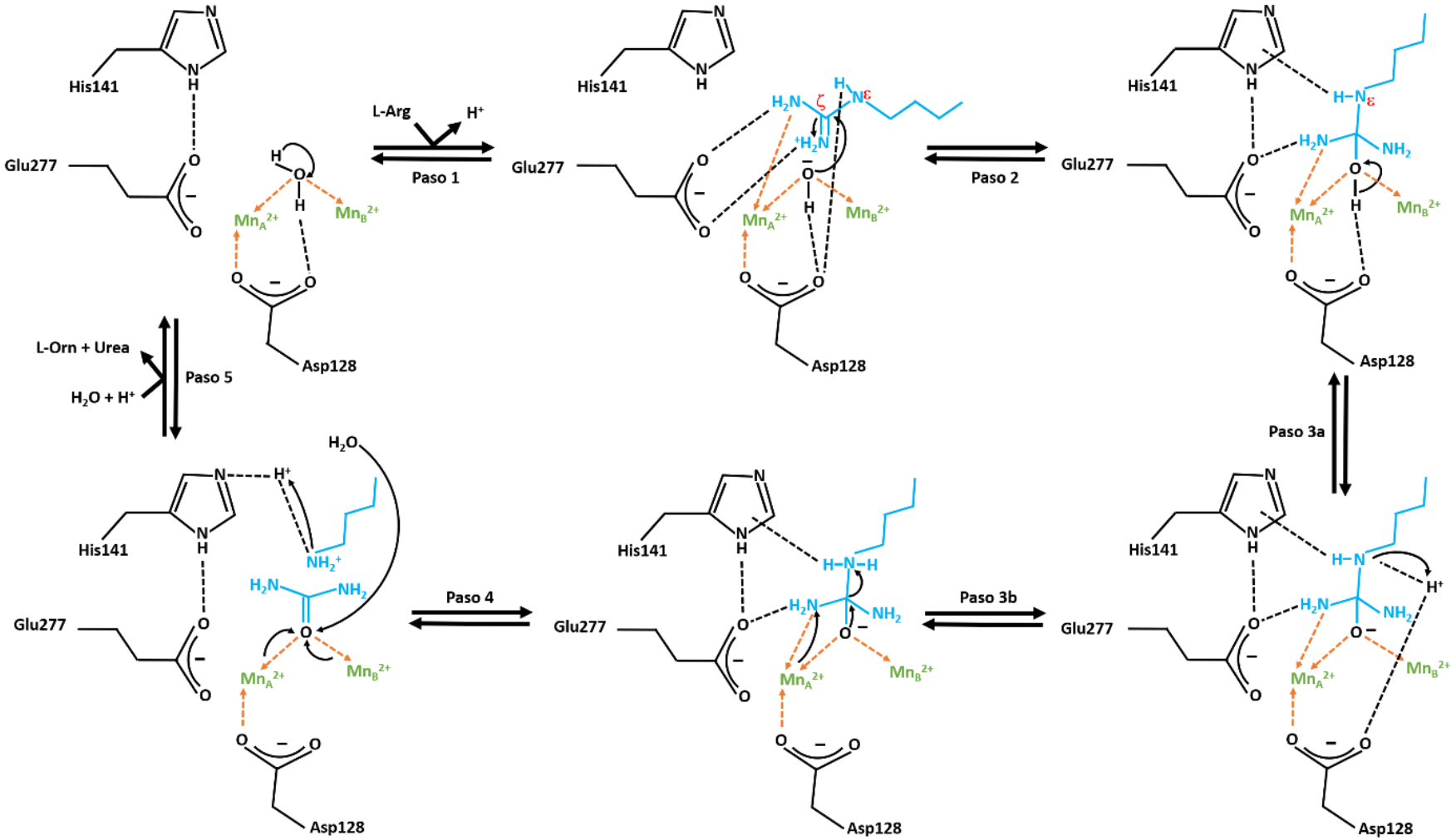


**Figura 11.** Mecanismo propuesto para la hidrólisis de la L-Arg basado en la estructura cristalografía de rata y simulaciones de dinámica molecular (Modificado de Kanyo et al. 1996; Velázquez-Libera et al. 2020, Hernandez et al. 2021).

### 2.5.1 LAS LEGUMINOSAS Y RIZOBIAS

Las leguminosas (Familia Fabaceae) comprende cerca de 19,300 especies principalmente terrestres y que forman parte de casi todos los tipos de vegetación del mundo (Sprent 2009). La mayoría de las especies de leguminosas pueden realizar la BNF cuando establecen relaciones simbióticas con las rizobias, las cuales son bacterias Gram-negativas, aerobias facultativas y móviles. Taxonómicamente son un grupo diverso de bacterias, que abarca aproximadamente 180 especies, ubicadas en 21 géneros, que pertenecen a las clases $\alpha$ y $\beta$-proteobacterias (Lindström y Mousavi 2020).

Para llevar a cabo la BNF en la relación simbiótica leguminosa-rizobia, es necesario un órgano especializado que provee las condiciones necesarias para la actividad de nitrogenasa. Este órgano se encuentra frecuentemente en la raíz, pero en algunos casos en el tallo (Sprent 2008) y puede ser clasificado como determinado, si el tejido meristemático es transitorio e indeterminado, si es permanente, lo cual va a depender de la bacteria, ya que algunas plantas pueden desarrollar los dos tipos (Fernández-López et al. 1998).

### 2.5.2 EL PROCESO DE NODULACIÓN

En condiciones de escasez de nitrógeno, la raíz de la planta exuda una mezcla de compuestos hacia la rizosfera, entre los que destacan los flavonoides. Estas moléculas pueden difundir a través de las membranas de las rizobias, funcionado como un quimioatrayente e induciendo la síntesis de la proteína NodD (Fisher y Long 1992; Wang et al. 2012; Downie 2014). Esta proteína es un regulador transcripcional del tipo LysR, que activa la expresión de los genes implicados en el proceso de nodulación, incluidos los necesarios para la síntesis del factor Nod, que es una molécula señal producida y secretada por las rizobias, la cual es detectada por la planta para la

inducción de la organogénesis del nódulo (Oldroyd y Downie 2008). Los genes *nodABC* codifican para las proteínas encargadas de la síntesis de la estructura central del factor Nod, el cual tiene una cadena principal de *N*-acetilglucosamina con una cadena acil graso en el extremo no reductor. El núcleo del factor Nod puede variar en la longitud del oligosacárido y naturaleza del ácido graso. Además, puede ser modificado por proteínas específicas de cada especie, lo que da como resultado varias sustituciones, que incluyen acetilaciones, glicosilaciones, metilaciones y sulfataciones. Estas variaciones en la estructura del factor Nod en conjunto con el espectro de flavonoides exudados por la planta, son las que dan especificidad para la interacción planta-bacteria (Broughton et al. 2000; Wang et al. 2012; Downie 2014).

La percepción de la señal del factor Nod en las leguminosas está mediada por receptores de serina/treonina quinasas, con motivos de lisina de unión a *N*-acetilglucosamina (LysM) en el domino extracelular, que están localizadas en la membrana plasmática (Wang et al. 2012; Downie 2014). Una vez que los factores Nod son reconocidos por la planta, se produce oscilaciones de calcio, degradación de la pared celular, reordenamiento del citoesqueleto y un tráfico de vesículas, lo que a su vez produce cambios en las células de la epidermis como las del córtex de la raíz (Xie et al. 2012).

Las células de la epidermis de la raíz se rizan atrapando a las bacterias adyacentes, formado una bolsa de infección (Esseling et al. 2003). En este compartimento las bacterias crecen y se dividen, formando el tubo de infección, las cuales son invaginaciones que cruzan las células de la epidermis y permitiendo la invasión bacteriana a las células corticales. De forma simultánea a las repuestas epidérmicas, las células corticales debajo de los sitios de infección activan la mitosis para formar un nódulo primordial, el lugar al cual las rizobias serán liberadas por el tubo

de infección a través de un mecanismo de tipo endocítico, que encapsula las bacterias dentro de una membrana proveída por la célula de la planta. Esta membrana en conjunto con la bacteria se denomina simbiosoma y dentro de la cual la bacteria se diferencia a bacteroide, la forma responsable de la fijación de nitrógeno (Oke y Long 1999; Brewin 2004).

Esta relación mutualista se basa en la complementación metabólica del huésped-hospedero, donde cada uno provee la falta de nutrientes del otro, ya que la bacteria proporciona una fuente de nitrógeno a la planta a cambio de una fuente de carbono y energía (Kondorosi 2013).

### 2.5.3 IMPORTANCIA DEL METABOLISMO DE LA L-Arg EN LA SIMBIOSIS

Unos de los factores que afecta el establecimiento de una relación simbiótica efectiva (nodulación y fijación de nitrógeno), es el metabolismo de los 22 aminoácidos, los cuales pueden ser provistos por la bacteria o la planta hospedera, ya que las rutas están interconectadas (Randhawa y Hassani 2002; Dunn 2015). Específicamente en cuanto al metabolismo de la L-Arg en las rizobias, existen algunos estudios realizados en su biosíntesis y catabolismos, determinando la función del gen en vida libre y/o en simbiosis.

#### 2.5.3.1 ESTUDIOS SOBRE LA BIOSINTESIS DE LA L-Arg Y SU EFECTO EN LA SIMBIOSIS

Partiendo de la biosíntesis, se sabe que a pesar de que no se ha encontrado un *argA* en el genoma de las rizobias, por los estudios hechos en *S. meliloti* Rm1021 se sabe que la existencia del gen es necesaria, ya que los ensayos de actividad enzimática de la ArgJ demostraron que es una enzima monofuncional, capaz de utilizar únicamente NAO y L-Glu como sustratos para sintetizar NAG y L-Orn (Hernandez et al. 2015). En este estudio también se determinó que la ArgB es el punto de regulación a nivel bioquímico en la vía, por medio de la inhibición alostérica

con L-Arg. Además, se observó que la mutación de su ORF a través de la interrupción con un casete de Sp, resultó en una auxotrofia para L-Orn y L-Arg cuando se utilizó amonio como fuente de nitrógeno en el medio, lo cual fue restaurado por la clonación del gen en pBBR1MC-5 e introducido en la cepa mutante.

En *Rhizobium etli* CE3 se realizó la mutación del gen *argC* utilizando el transposón Tn5, lo cual generó auxotrofia para NAO, L-Orn, L-Cit y L-Arg en vida libre, cuando se utilizó amonio como fuente de nitrógeno (Ferraioli et al. 2001). Esta condición puede ser restaurada por la clonación del gen en el pAR207 y su introducción en la cepa mutante. Posteriormente, las dos cepas fueron utilizadas en la inoculación de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), observando que la cepa mutante fue incapaz de inducir la formación de nódulos en la raíz, debido a que no sintetizaron los factores de nodulación; mientras que la cepa complementada sí produjo nódulos, pero su eficiencia en la fijación de nitrógeno fue del 65 % respecto a la cepa silvestre. Por otra parte, por medio de la complementación química con 50 $\mu$g $mL^{-1}$ de L-Arg también se recobró parcialmente el fenotipo silvestre (Ferraioli et al. 2001).

En *S. meliloti* Rm1021 también se ha mutado el *argC*, por medio de la interrupción de su ORF con un casete de Sp, lo que generó una auxotrofia tanto para L-Orn y L-Arg cuando el medio contiene amonio como fuente de nitrógeno en vida libre. Esta condición fue restaurada por la clonación del gen en el pBBR1MC-5 y su posterior introducción en la cepa mutante o por la adición de L-Orn o L-Arg en el medio (Díaz et al. 2011; Hernández et al. 2015). Cuando la cepa fue inoculada en plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), no se observaron cambios en la nodulación y fijación de nitrógeno, pero sí para el peso seco, respecto a las plantas inoculadas con la cepa silvestre, representando únicamente el 67 % (Vargas-Lagunas et al. 2017).

En *R. etli* CFN42 y *S. meliloti* Rm1021 la mutación del *argE* a través de un casete de Km y Sp, respectivamente, demostró que el gen no es indispensable para el crecimiento en vida libre utilizando amonio como fuente de nitrógeno (Villaseñor et al. 2011). Esto se debe a la presencia de otros genes que son capaces de desempeñar la misma función en la bacteria, como lo son el *argJ* y los *hipOs*. Por esta misma razón una doble mutante (*argEJ*) en *S. meliloti* Rm1021 con diferentes casetes de resistencia a antibióticos, tampoco produjo un fenotipo distinto a la silvestre, cuando se utilizó amonio como única fuente de nitrógeno (Hernendez et al. 2015).

Por medio de la utilización de ácido nitroso se han generado distintas cepas mutantes en *S. meliloti* 104A14. Basados en los ensayos de complementación química se determinó que algunas mutaciones podrían corresponder al gen *argB, argC o argD*, debido a que únicamente crecen cuando el medio contiene NAO, pero no cuando NAG. Otras probablemente están mutadas en el gen *carA* o *carB*, debido a que son auxotrofas tanto para L-Cit y uracilo. Adicionalmente, otras cepas únicamente crecen cuando el medio contiene L-Cit, pero no con L-Orn, por lo que la mutación podría ubicarse en el *argF*. Por último, existe una posible mutante en el gen *argG*, ya que únicamente crece cuando se adiciona arginosuccinato al medio, pero no cuando se suplementa con L-Cit. Las dos últimas mutantes muestran un fenotipo simbiótico, mientras que las anteriores no (Kerppola y Kahn 1988a; 1988b).

Otro trabajo realizado en *S. meliloti* 104A14 utilizando el transposón *Tn*5 genero mutantes para los genes *argA* al *argE*, debido a que fueron auxotrofas para L-Orn. Cuando las cepas fueron inoculadas en plantas de alfalfa, los nódulos fueron blancos, esféricos y localizados en las raíces laterales principalmente. Dichos nódulos no son funcionales debido a que la biomasa generada por las plantas inoculadas con las cepas fue similar al de las plantas sin inocular, representando

el 20 % respecto a las plantas inoculadas con la cepa silvestre. Por otra parte, cuando las cepas mutantes probablemente para los genes *argF*, a*rgG* o *argH* debido a su auxotrofia para L-Arg, son inoculadas en plantas de alfalfa, los nódulos formados son de color rosa, de forma cilíndrica y distribuidos de manera uniforme en la raíz de la planta. Estos nódulos son funcionales, debido a que el peso seco de las plantas inoculadas con estas cepas es similar a la silvestre (Kumar et al. 2003).

Recientemente se construyó una cepa de *S. meliloti* Rm2011 cuyos megaplásmidos fueron deletados y utilizada en ensayos de mutagénesis al azar con el transposón Tn5-para demostrar la redundancia genética que existe en la especie. El trabajo demostró que el gen *argH* existe tanto en el cromosoma como en el pSymB y, además, que probablemente el *argD* y *argF* también tienen una copia en el plásmido (diCenzo y Finan 2015).

Por otra parte, en *Mesorhizobium loti* JRL501 la mutación del gen *argF* utilizando el transposón Tn5, provoca auxotrofía para L-Cit y L-Arg, la cual es restaurada por complementación química con 0.23 mM de alguno de los aminoácidos citados. 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-Cit o L-Arg (Mishima et al. 2008).

Con base en lo expuesto, se ha llegado a la conclusión de que la biosíntesis de L-Arg 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-Orn más que de L-Arg (Dunn 2015;

Kumar et al. 2003).

### 2.5.3.2 ESTUDIOS SOBRE LA DEGRADACIÓN DE LA L-Arg Y SU EFECTO EN LA SIMBIOSIS

En cuanto a la degradación de la L-Arg se refiere, se sabe que la mayoría de las rizobias usadas como modelo de estudio, cuentan con la ruta de la arginasa, arginina deiminasa y/o arginina descarboxilasa (Dunn 2015).

En *Rhizobium etli* CNPAF512 se identificaron los genes *arcA*, *arcB* y *arcC* que codifican para la arginina deiminasa, (EC 3.5.3.6), ornitina carbamoiltransferasa (EC 2.1.3.3) y carbamato kinasa (EC 2.7.2.2), respectivamente; los cuales forman la ruta de la arginina deiminasa. Los ensayos de nodulación y fijación de nitrógeno con plantas de frijol inoculadas con una cepa mutante en el gen *arcA*, demostraron que la actividad de reducción de acetileno fue menor comparada con la cepa silvestre, aunque no existieron diferencias en el peso seco de los nódulos y el de las plantas (D'hooghe et al. 1997). En *S. meliloti* Rm1021 también se ha estudiado la ruta y se encontró que la mutación de *arcA* o *arcB* no tiene un efecto sobre la nodulación y fijación de nitrógeno, cuando las cepas son inoculadas en plantas de alfalfa (Bobik et al. 2006).

En *S. meliloti* GR4 la mutación de la ornitina ciclodeaminasa (OCD, EC 4.3.1.12) involucrada en la formación de L-Pro y amonio a partir de L-Orn, genera un retraso en el proceso de nodulación y una baja cantidad de nódulos (Soto et al. 1994). Otra enzima involucrada en la degradación de L-Orn es la ornitina descarboxilasa, la cual genera Put y amonio (ODC, EC 4.1.1.17). Por ensayos de actividad enzimática se demostró que en *S. meliloti* Rm8530 el gen *sma0680* codifica para la ODC1 y su mutación por medio de la inserción de un casete de Sp reduce un 14 % la actividad de ODC, aproximadamente un 10 % la producción de poliaminas como la Put,

espermidina y homoespermidina, mientras que la velocidad especifica de crecimiento no difiere de la cepa silvestre. Este resultado se explica por la presencia de la ODC2 codificada por *smc02983*, la cual también descarboxila L-Lys (EC 4.1.1.18). La mutación de ODC2 utilizando la misma metodología que en ODC1, resultó en la perdida de actividad de ODC en un 55 %, la reducción de la velocidad especifica de crecimiento hasta un 42 % y la producción de espermidina, homoespermidina y Put hasta un 18, 9 % y niveles apenas de traza, respectivamente en comparación a la cepa silvestre. El fenotipo silvestre puede ser restaurado por complementación química con 1 mM de Put o espermidina o genética, por la clonación de la ODC2 en el pBBR1MCS-5 y su posterior introducción en la cepa mutante. La mutación conjunta de ODC1 y 2, dan como resultado una cepa con actividad de apenas un 25 % para ODC, mientras que los niveles de poliaminas y la velocidad especifica de crecimiento son similares a la mutante sencilla en *odc2* (Becerra-Rivera et al. 2018). Cuando la cepa mutante en ODC2 fue evaluada en diferentes variables asociadas con el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno, se observó una reducción en la producción de exopolisacaridos (EPS), un 42 % más bajo velocidad de crecimiento especifico en presencia de peróxido de hidrogeno ($H_2O_2$), una reducción del 40 % de movilidad y un 25 % mayor formación de biofilm, en comparación a la cepa silvestre. Cuando la cepa fue inoculada en plantas de alfalfa, se determinó un aumento en un 50 % del número de nódulos, aunque estos eran blancos y pequeños, representando aproximadamente un 80 % de biomasa en comparación a los nódulos formados por plantas inoculadas con la cepa silvestre y con una reducción en la capacidad de reducir acetileno del 25 %. Lo anterior trajo como resultado una disminución en un 40 % del peso seco de las plantas inoculadas con la cepa mutante en *odc2* (Becerra-Rivera et al. 2019).

De forma similar a lo que sucede en la biosíntesis de L-Arg, los mayores efectos en cuanto a la nodulación y fijación de nitrógeno están relacionados con el metabolismo de la L-Orn, aunque estos difieren de la relación simbiótica estudiada.

## 2.6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó, de las cinco rutas para la degradación de la L-Arg, al menos tres pueden ser encontradas en las rizobias que se consideran como modelo de estudio. La ruta de la arginina deiminase que actúa bajo condiciones de microanaerobiosis ha sido parcialmente estudiada en *R. etli* y *S. meliloti,* y su efecto en el establecimiento de una relación simbiótica ha sido determinado. Por otra parte, la ruta de la arginina descarboxilasa y arginasa permanecen sin elucidar, las cuales están relacionadas con la producción de poliaminas y el control de los niveles intracelulares de L-Arg y L-Orn, respectivamente. Basados en lo anterior y debido al impacto que tiene la L-Orn en el establecimiento de una relación simbiótica efectiva, se propone el estudio de la vía de la arginasa en *S. meliloti* Rm1021. Este microorganismo pertenece a las $\alpha$-proteobacterias y es Gram negativo, con la habilidad de establecer relaciones simbióticas con plantas del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Su genoma comprende 6.7 megabases (Mb), que está dividido en un cromosoma (3.65 Mb) y dos megaplasmidos (pSymA de 1.35 Mb y pSymB de 1.68 Mb), los cuales contribuyen en diversos grados en una simbiosis efectiva (Barnety et al. 2001). Además, cuenta con dos posibles arginasas, ArgI1 (*smc03091*) ubicada en el cromosoma y ArgI2 (*sma1711*) en el megaplásmido psymA y la ausencia de un regulador global del metabolismo de la L-Arg (Dunn 2015). Esto hace a la bacteria un modelo de estudio interesante, ya que posiblemente cada una de las arginasas podría establecer una función

específica en vida libre y/o simbiosis, además, de que la regulación podría ser a nivel genético por un regulador aún desconocido o a nivel bioquímico, por retroalimentación de L-Orn.

## 3. HIPÓTESIS

1) La enzima ArgI1 y ArgI2 son funcionales.

2) La mutación en *argI* tiene un efecto negativo en la cinética de crecimiento.

3) El gen *sma0662* regula de forma directa la expresión de *argI1*.

4) La mutación en *sma0662I* tiene un efecto en la cinética de crecimiento.

# 4 OBJETIVO

## 4.1 GENERAL

Caracterizar genética y bioquímicamente la vía de la arginasa en *S. meliloti* Rm1021.

## 4.2 ESPECIFÍCO

1) Determinar si ArgI1 y ArgI2 son funcionales.

2) Caracterizar una cepa mutante en ArgI1 en vida libre.

*3)* Determinar si *sma0662* regula la expresión de *argI1.*

4) Determinar si la regulación es de manera directa o indirecta.

5) Caracterizar una cepa mutante en *sma0662* en vida libre.

6) Determinar las características bioquímicas de ArgI1.

## 5. METODOLOGÍA

Todos los detalles del apartado son descritos en el artículo publicado (Ide et al. 2020).

## 6. RESULTADOS

En este apartado se realiza un resumen de los resultados publicados en el artículo publicado Ide et al. (2020).

### 6.1 ArgI1 ES FUNCIONAL *IN VITRO*

En el genoma de *S. meliloti* existen dos posibles arginasas, *argI1* (*smc03091*) y *argI2* (*sma1711*), ubicadas en el cromosoma y pSymA, respectivamente. A nivel de secuencia de aminoácidos las dos proteínas comparten 27.1 % de identidad y 43.6 % de similitud. Para determinar su funcionalidad tanto *in vitro* como *in vivo*, primero se analizó la secuencia de ambas proteínas utilizando Clustal Omega (Sievers y Higgin 2014), encontrando que la ArgI1 tiene los seis sitios de unión al metal conservados, los cuales están en 10 de las 11 arginasas caracterizadas en bacterias. Por otra parte, la ArgI2 únicamente tiene cuatro, reemplazando la H91 por C y la H118 por N (Figura 12).

Posteriormente, los genes fueron clonados y sobreexpresados en *E. coli* BL21 (DE3) como 6His-Sumo-ArgI1 y 6His-SumoArgI2. Por medio de los ensayos de actividad enzimática del extracto total, se demostró que únicamente ArgI1 era capaz de utilizar L-Arg como sustrato, con actividad especifica de 2552 ±126 nmol L-Orn $min^{-1}$ mg $proteina^{-1}$, lo cual claramente no fue detectable en ArgI2.

## 6.2 ArgI1 ES IMPORTANTE EN EL CRECIMIENTO EN VIDA LIBRE

Debido a que únicamente ArgI1 mostró actividad enzimática, se generó tanto una cepa mutante (1021argI1) como una complementada genéticamente (1021argI1(argI1)) (Tabla 1, Ide et al. 2020).

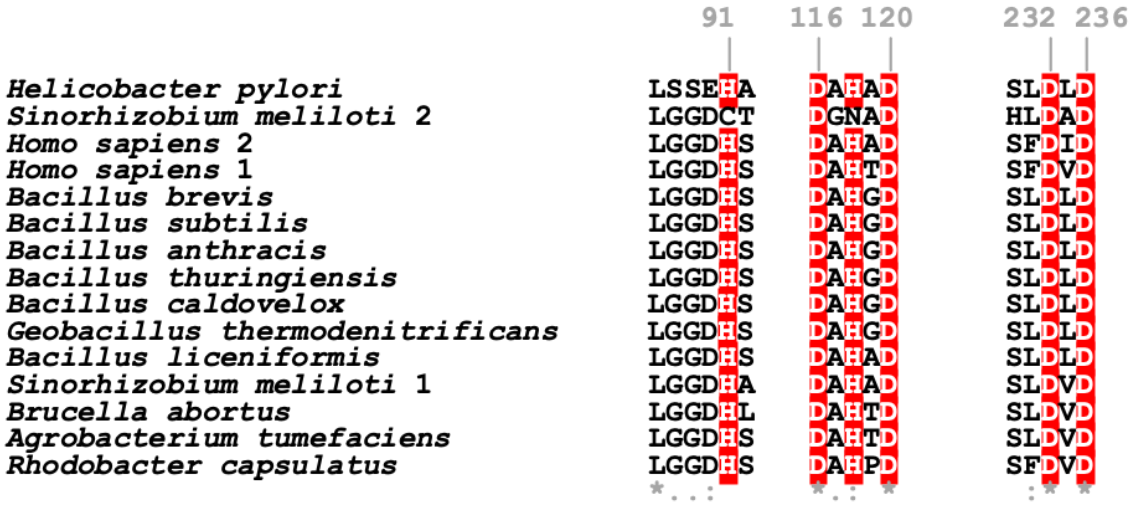


Figura 12. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las arginasas caracterizadas en bacterias y humano. En fondo rojo se muestran los residuos conservados de unión a metal y con un numero en la parte superior, la posición que ocupan en la arginasa de *H. pylori*.

Los ensayos de actividad enzimática del extracto total de la cepa 1021argI1 crecida en MMS-$NH_4$ en presencia y ausencia de L-Arg exógena (1 mM), mostraron que la cepa carece de actividad de arginasa detectable (Figura 13). Lo anterior difiere de la cepa 1021, que mostró una actividad específica de 206 ±20 nmol L-Orn $min^{-1}$ mg $proteina^{-1}$, la cual se incrementó en el medio suplementado hasta un 430 % (877 ±103 nmol L-Orn $min^{-1}$ mg $proteina^{-1}$). Por otra parte, el fenotipo silvestre fue recuperado en la cepa 1021argI1(argI1).

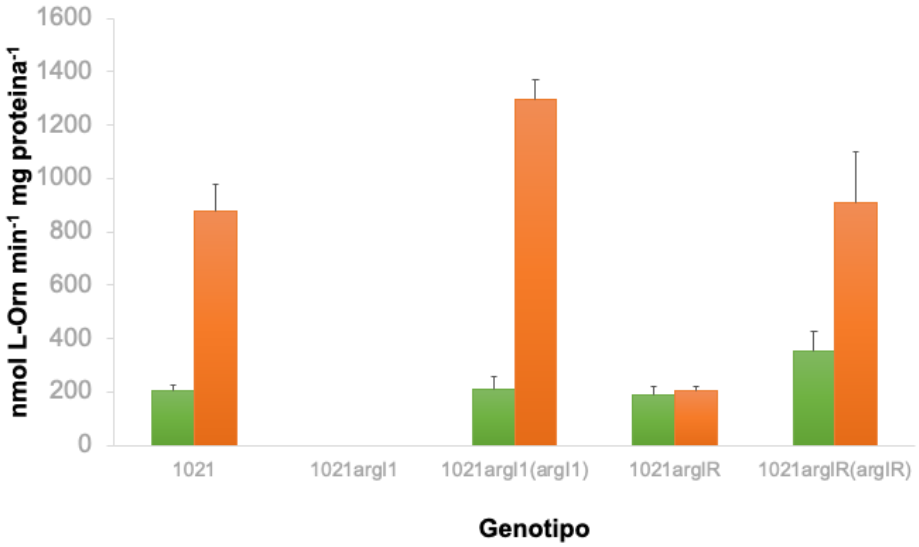


**Figura 13.** Actividad de arginasa del extracto total de diferentes genotipos de *S. meliloti* crecidas en MMS-$NH_4$ sin (■) y con L-Arg (■).

Cuando las cepas fueron crecidas en MMSA, las tres mostraron una cinética de crecimiento similar cuando fueron ajustados con respecto a 1021 (Figura 14 y Tabla 2). Por otra parte, en el medio MMS-Arg la cepa 1021argI1 tuvo una $\mu$ de 0.032 y alcanzó una $DO_{620}$ del 32 % a las 32 h, en comparación con la 1021. En contraparte, la cepa complementada mostró una $\mu$ de 0.175 y $DO_{620}$ del 113 %, respecto a la cepa silvestre. Por último, cuando el medio fue MMS-Orn, la cepa 1021argI1 y 1021argI1(argI1) mostraron una $\mu$ del 0.109, que difiere de la cepa silvestre, pero fue restaurada en la complementada geneticiamente.

## 6.2 LA L-Arg INDUCE LA EXPRESIÓN DE *argI1*

Como la presencia de L-Arg exógena en el MMS-$NH_4$ aumentó la actividad enzimática en el extracto total en la cepa 1021, se procedió a determinar el efecto tanto de la L-Arg como de la L-Orn en la expresión del gen, siendo el sustrato y el producto de la reacción catalizada por la

arginasa, respectivamente. El experimento fue realizado por medio de una fusión transcripcional con el gen reportero *gusA*.

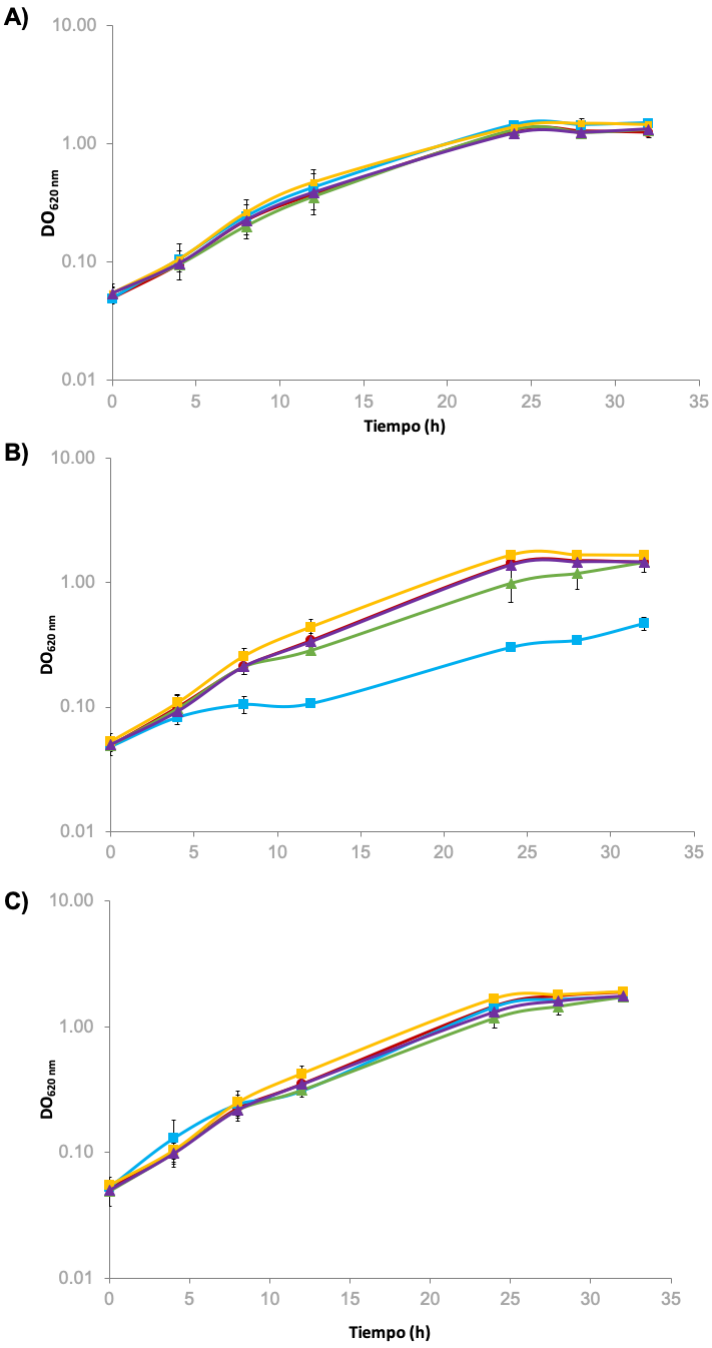

**Figura 14.** Cinética de crecimiento de diferentes genotipos de *S. meliloti* en MMS-$NH_4$ (a), MMS-Arg (b) y MMS-Orn (c). 1021 (●), 1021argI1(■), 1021argI1(argI1) (■), 1021argIR (▲) y 1021argIR(argIR) (▲).

**Tabla 2.** Velocidad específica de crecimiento de diferentes cepas de *S. meliloti* bajo condiciones de MMS con diferentes fuentes de nitrógeno.

| Cepa | Condición y velocidad de crecimiento específico (μ) | | |
|---|---|---|---|
| | $NH_4$ | Arg | Orn |
| 1021 | 0.155 | 0.155 | 0.157 |
| 1021 argI1 | 0.174 (1.12) | 0.032 (0.21) | 0.109 (0.69) |
| 1021argIR | 0.164 (1.06) | 0.135 (0.87) | 0.145 (0.92) |
| 1021argI(argI1) | 0.187 (1.21) | 0.175 (1.13) | 0.176 (1.12) |
| 1021argIR(argIR) | 0.172 (1.11) | 0.161 (1.04) | 0.157 (1.00) |

* Los valores entre paréntesis fueron ajustados respecto a la cepa 1021

Los ensayos de actividad enzimática de GusA fueron realizados en células cosechadas en tres diferentes puntos de la fase de crecimiento exponencial (Figura 15), observando que la expresión de *argI1* se incrementó con la edad del cultivo, tanto en el MMS-$NH_4$ como el suplementado con L-Orn, mientras que en el medio que contenía L-Arg, la expresión fue un 17 % menor a las 12 h, respecto a las 6 h. Por otra parte, cuando se comparó la expresión de *argI1* en el medio sin suplementar con los medios suplementados, la expresión siempre fue mayor en los últimos para los tiempos evaluados, siendo mayor la diferencia cuando el medio contenía L-Arg (240 a 540 % mayor al medio sin suplementar).

### 6.3 ArgIR (SMc03092) REGULA POSITIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE *argI1*

Como se demostró en el experimento anterior, la L-Arg induce la expresión de *argI1* y debido a la ausencia del ortólogo de ArgR, el cual regula el metabolismo del aminoácido en otras bacterias, se pensó en la posibilidad de que la arginasa podría ser regulada a nivel

transcripcional por *smc03092*, que se encuentra a 155 nt de forma divergente y esta anotado como un regulador tipo LRP.

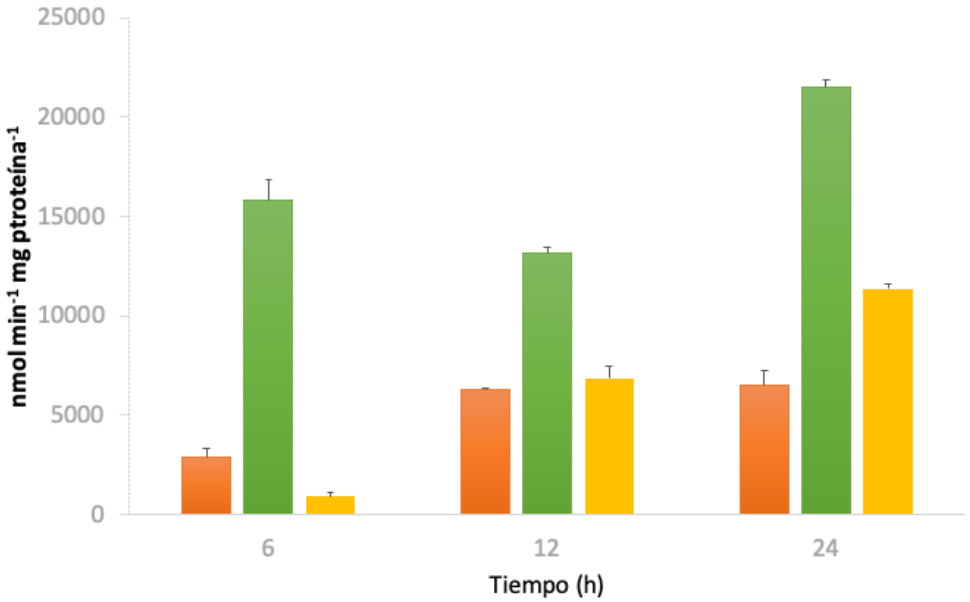


**Figura 15**. Actividad específica de GusA del extracto total para el promotor de *argI1* de la cepa 1021, en MMS-$NH_4$ (■), con 1 mM de L-Arg (■) o 1 mM de L-Orn (■).

Para demostrar esta hipótesis se analizó la expresión de *argI1* por medio del gen reportero *gusA*, tanto en la cepa mutante en el regulador (1021smc03092), como en 1021, en MMS-$NH_4$ y suplementado con 1 mM de L-Arg (Figura 16). En el medio suplementado, la cepa silvestre tuvo una actividad específica de GusA del 430 % respecto al medio sin suplementar. Por otra parte, en la cepa 1021smc03092 los valores de la actividad específica de GusA entre ambos medios fueron similares. Además, cuando se comparan las actividades entre las cepas en el medio no suplementado se encontró que 1021smc03092 es únicamente el 56 % respecto a la cepa 1021, mientras que en el medio suplementado la diferencia aumento, siendo el valor de la actividad para 1021smc03092 del 14 % en comparación con 1021. Lo anterior indica que

SMc03092 regula positivamente la expresión de *argI1* en respuesta a L-Arg, por lo que fue denominado ArgIR.

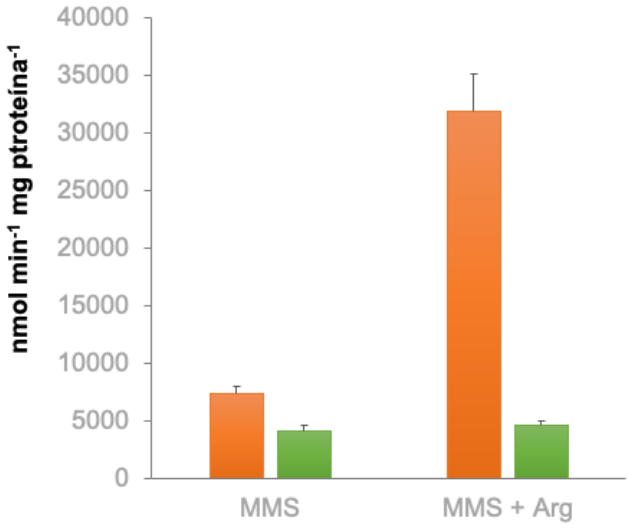


Figura 16. Actividad específica de GusA del extracto total para el promotor de argI1, en MMS-$NH_4$ con y sin 1 mM de L-Arg, en la cepa 1021 (■) y 1021argIR (■).

## 6.4 LA EXPRESIÓN DE *argIR* NO AUMENTA EN PRESENCIA DE L-Arg

Debido a que ArgIR regula positivamente la expresión de *argI1* en presencia de L-Arg, se analizó su expresión de forma similar a lo realizado con *argI1*. La expresión de *argI1R* fue similar entre las 6 y 12 h de crecimiento para cada una de las condiciones analizadas, pero a las 24 h hubo una reducción generalizada, la cual fue en promedio de un 59 ±3 % para las tres condiciones evaluadas (Figura 17). Por otra parte, en presencia de L-Arg la expresión del regulador fue siempre menor, respecto al medio sin suplementar a través del tiempo, siendo del 76 ±3 % en promedio, mientras que en presencia de L-Orn fue del 90 ±6 %. Lo anterior indica que la L-Arg o L-Orn no incrementan la expresión del regulador, pero sí ejercen una ligera represión.

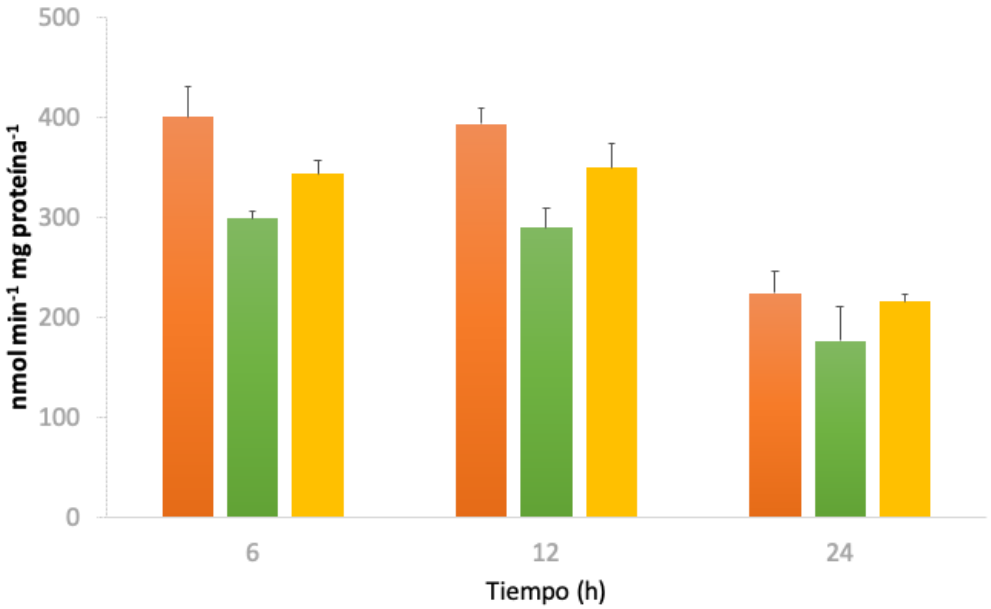


**Figura 17.** Actividad específica de GusA del extracto total para el promotor de *argIR* de la cepa 1021 en MMS-$NH_4$ (■), con 1 mM de L-Arg (■) o 1 mM de L-Orn (■).

## 6.5 ArgIR SE UNE DIRECTAMENTE AL DNA

Como se demostró que ArgIR regula de forma positiva a *argI1*, la siguiente pregunta a resolver fue si la regulación se realizaba de forma directa o indirecta. Para determinar dicha cuestión, se analizó la secuencia intergénica de *argI1*, por medio del programa BPROM (http:// softberry.com) y Virtual Footpring (Münch et al. 2005). La caja -10 se ubicó entre los nt 53 y 67, río arriba del inicio de la traducción, mientras que la caja -35 entre 79 y 84 nt (Figura 18). Por otra parte, se encontraron tres posibles sitios de unión a ArgIR, los cuales fueron ubicados entre los nt 53 y 67; 108 y 122; y 124 y 138 río arriba del inicio de la traducción. Los dos primeros sitios se encontraron río arriba del posible promotor de *argI1*, mientras que el tercero traslapa con dicha región.

5' AGAGCGCTGATGAGCGCCTGATCGAGATCATCCATCTTGTCACTTCGTCAA
AAAAGACTTTACACTTTGCGCATCTTATCTTCCCAATCGACAGTTTTCCAT
CTTTTTGCCGCCACGCTTTTTTGACGATAATCCGCCGGACTTCACGGGAACC
GAACTTCCCGGCAACAGGGCGAAGGGACGAGGCGGACATGAAAACCATCAC 3'

Figura 18. Análisis de la región intergénica de *argI1*. En letras moradas se muestra parcialmente la región codificante para *argIR* y en naranja para *argI1*. En cuadros morados se indican los potenciales sitios de unión a ArgIR, en fondo verde la región de -35 y en amarillo la -10.

Con base en estos resultados se diseñaron tanto el fragmento F1, que incluyó toda la región intergénica más 35 nt del ORF de ArgIR; como el F2, que abarcaba 107 nt río arriba del inicio de la traducción de *argI1* (Figura 19). Ambos fragmentos fueron utilizados en conjunto con diferentes concentraciones de la proteína purificada 6His-Sumo-ArgIR, para realizar un ensayo de cambio en la movilidad electroforética (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) con y sin L-Arg o L-Orn.

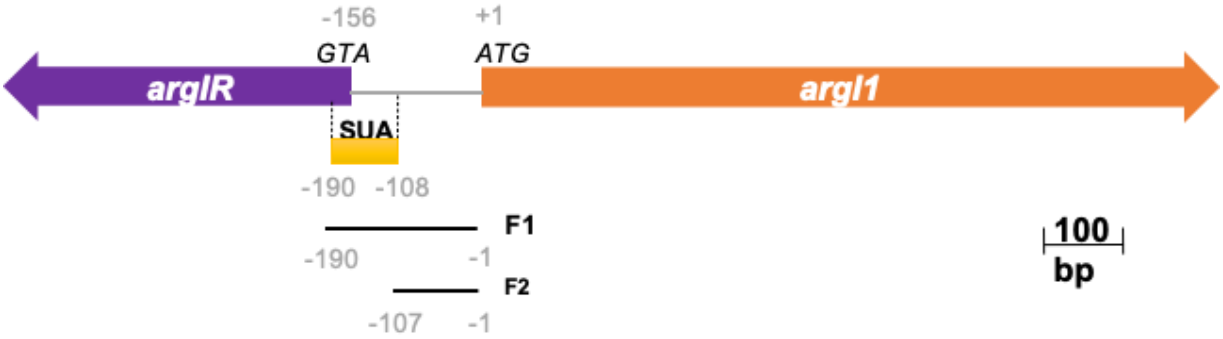


Figura 19. Arreglo genético de *argI1* y *argIR*. Con una flecha morada, se indica la región codificante para ArgIR y con una naranja para ArgI1. La línea gris corresponde a la región intergénica y la barra amarilla el sitio de unión de ArgIR (SUA). Los números en gris, indican la posición de cada uno de los elementos, respecto al inicio de la traducción *de argI1*. El GTA y ATG, son los inicios de la traducción para ArgIR y ArgI1, respectivamente.

Los resultados demostraron que, cuando la región intergénica está completa, el regulador fue capaz de unirse al DNA, provocando un retardo en la movilidad de F1 en concentraciones ≥1.2

μM, lo cual no fue observado con el F2 (Figura 20). Por otra parte, ninguno de los aminoácidos influyó en la afinidad del regulador por el fragmento de DNA. Estos resultados indicaron que ArgIR activa directamente la expresión de *argI1*, por unirse a secuencias río arriba del putativo promotor.

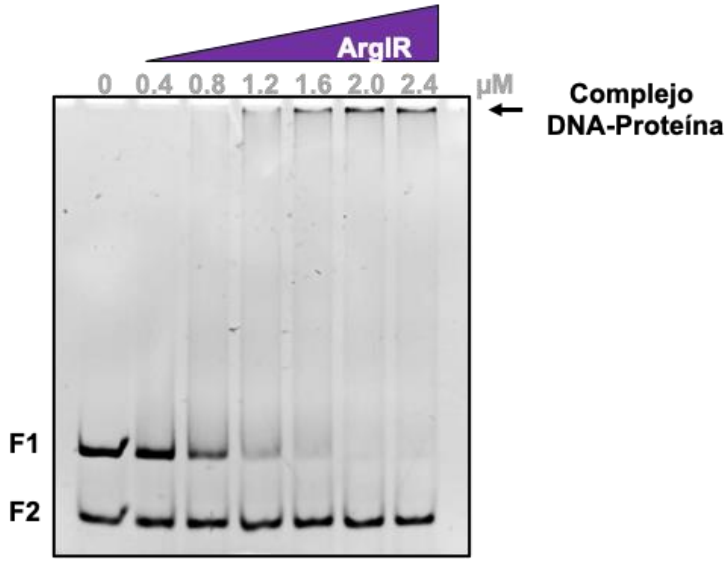


Figura 20. EMSA realizado con F1, F2 y diferentes concentraciones de 6His-Sumo-ArgIR.

Para demostrar que ArgIR era necesaria en la inducción de *argI1*, se realizó un ensayo de actividad de arginasa del extracto total de la cepa 1021, 1021ArgIR y 1021ArgIR(ArgIR); las cuales fueron crecidas en MMS-$NH_4$ en presencia y ausencia de L-Arg (Figura 14). Los resultados demostraron que, en ausencia del aminoácido la cepa 1021ArgIR obtuvo una actividad especifica similar a la 1021 (92 %), pero en su presencia la actividad especifica fue únicamente del 23 %, en comparación con la cepa silvestre. Dicha condición fue restaurada en la cepa complementada (103 %). Lo anterior demostró que la inducción de *argI1* por la L-Arg, es totalmente dependiente de argIR.

## 6.6 *argIR* NO ES INDISPENSABLE EN VIDA LIBRE

Para conocer la función de ArgIR en vida libre e, se realizó una cinética de crecimiento de forma similar a las realizadas para ArgI1 en la cepa 1021, 1021(argIR) y 1021(argIR). En condiciones de MMS-$NH_4$ no se observaron diferencias entre las cepas, mientras que en MMS-L-Arg la velocidad de crecimiento específico fue del 87 % en la cepa mutante en el regulador comparada con la cepa 1021 (Figura 14). Algo similar sucedió en condiciones de MMS-L-Orn, donde tanto la $DO_{620}$ como la velocidad de crecimiento específico fueron aproximadamente un 90 % en la mutante comparación con la cepa silvestre. En ambas condiciones la cepa complementada genéticamente mostró un fenotipo similar a la silvestre.

## 6.7 CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE ArgI1

### 6.7.1 PESO MOLECULAR Y ESTADO OLIGOMERICO

La enzima 6His-Sumo-ArgI1 purificada por cromatografía de afinidad, tuvo un peso molecular de 47 kDa, con base en el SDS-PAGE (Figura X), lo cual sugiere que la enzima nativa es de 34 kDa, ya que la etiqueta de 6His-Sumo tiene un peso aproximado de 13 kDa. Este resultado es similar a los 32.87 kDa calculados para la secuencia de aminoácidos de ArgI1 en la plataforma de expasy (). Por otra parte, la proteína forma oligómeros de tres unidades, con base en la electroforesis en un gel nativo con concentraciones crecientes de urea. Debido a que la enzima perdida rápidamente su actividad, la etiqueta de 6His-Sumo no fue retirada y los subsecuentes parámetros fueron determinados en estas condiciones.

### 6.7.1 COFACTORES

La actividad específica de la enzima fue determinada en presencia de 10 diferentes metales divalentes y los resultados fueron mostrados como actividades relativas con base en la actividad mostrada con $Mn2^{+}$ como cofactor en pH de 8.0 (Figura 21). En presencia de $Ni^{2+}$ y $Co^{2+}$ la enzima mostró una actividad del 168 % y 59 %, siendo las más altas, sin contar al $Mn^{2+}$. Por otra parte, en presencia de $Zn^{2+}$, $Fe^{2+}$ y $Ba^{2+}$ las actividades son en promedio del $10 \pm 2.6$ %, las cuales son bajas y similares a las reacciones sin el cofactor (7 %), mientras que el resto de metales evaluados inhibieron la actividad.

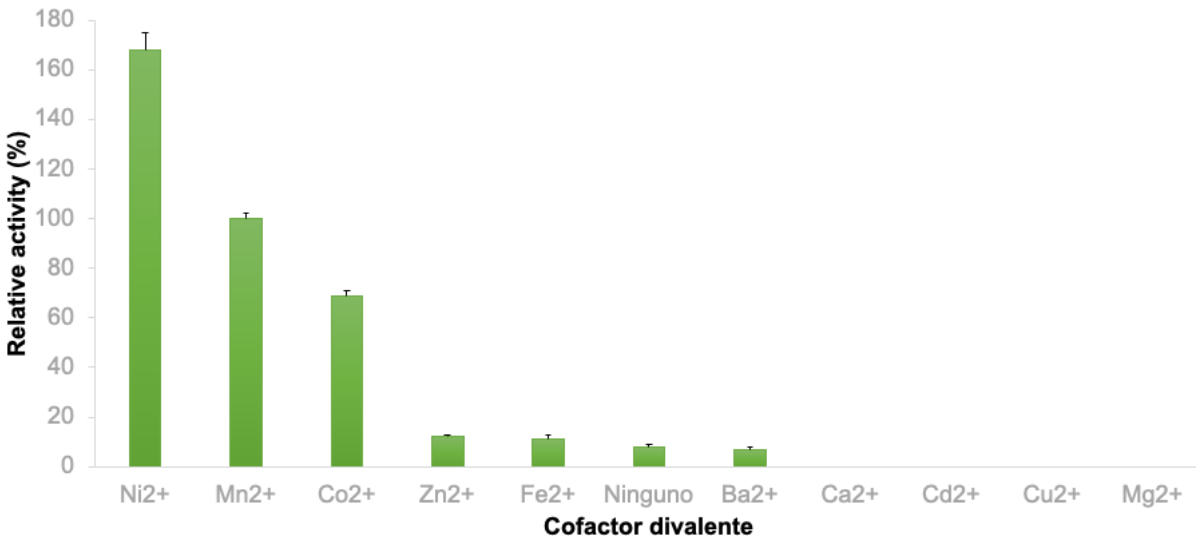


Figura 21. Actividad específica relativa de 6His-Sumo-ArgI1 en presencia de diferentes cationes metálicos divalentes.

### 6.7.2 pH

Como con $Ni^{2+}$, $Co^{2+}$ y $Mn^{2+}$ la enzima mostró su máxima actividad especifica en condiciones ligeramente alcalinas (pH=8.0), se determinó la misma variable, pero en un rango de pH entre 7.0 y 10.5, para los tres elementos; y los resultados fueron expresados de forma similar al

experimento anterior. Cada uno elementos influyo para que la enzima mostrara mayor actividad a diferentes condiciones de pH (Figura 22). La actividad más alta con $Ni^{2+}$ ocurrió en un pH de 7.5 y fue del 180 %, mientras que con $Co^{2+}$ se obtuvo hasta un 115 % en 9.0; y finalmente en presencia de $Mn^{2+}$ en 9.5 fue de 148 %.

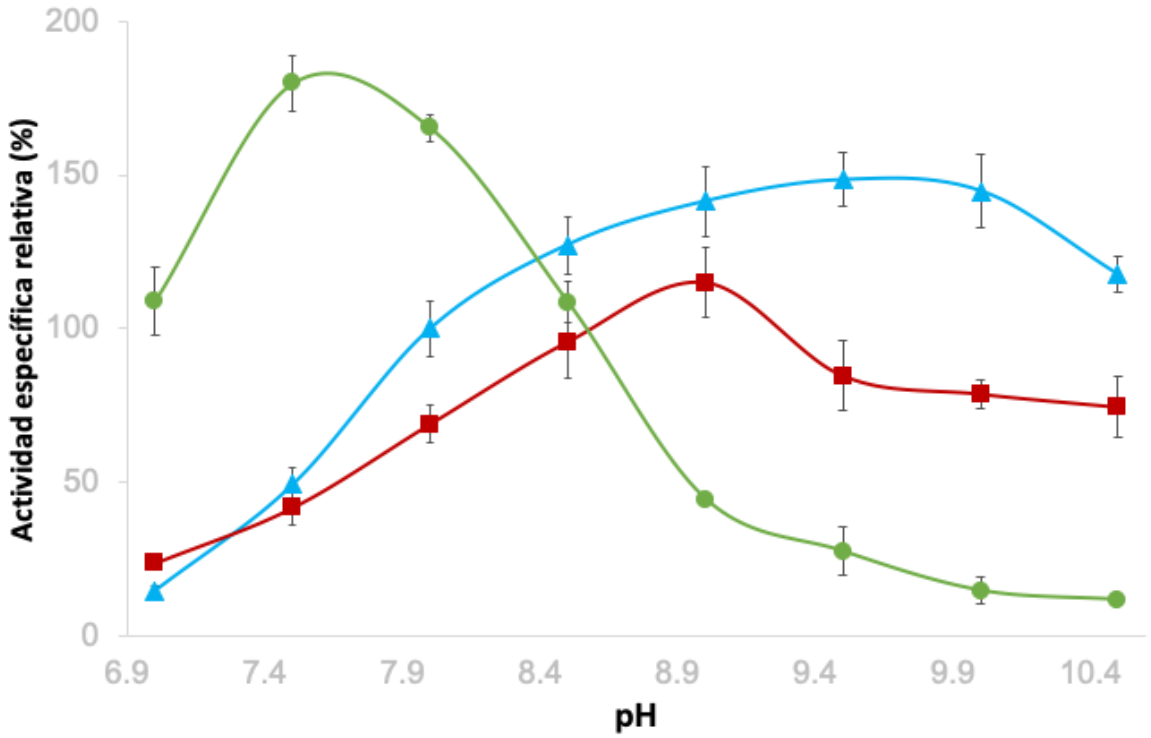


**Figura 22.** Actividad especifica relativa de la 6His-Sumo-ArgI1 en presencia de $Ni^{2+}$, $Co^{2+}$ y $Mn^{2+}$, bajo diferentes condiciones de pH.

### 6.7.3 $K_m$ y $V_{max}$

Se determinaron los parámetros cinéticos para la 6His-Sumo-ArgI1 a pH 8.0 en presencia de $Ni^{2+}$, $Mn^{2+}$ y $Co^{2+}$. Los resultados obtenidos entre $Mn^{2+}$ y $Co^{2+}$ fueron similares y diferentes a los de $Ni^{2+}$ (Tabla 3). Ajustando los datos obtenidos en presencia de $Ni^{2+}$ con respecto a $Mn^{2+}$, se determinó que la $K_{mL\text{-}Arg}$ fue un 48 % menor, con una $V_{max}$ del 181 % superior. Por otra parte, el número de recambio fue aproximadamente el tripe (2.77) y la eficiencia catalítica de 4.43 veces.

Tabla 3. Parámetros cinéticos de 6His-Sumo-ArgI1 con tres diferentes cofactores.

| | Catión | $K_{mL\text{-}arg}$ (mM) | $V_{max}$ ($\mu M.min^{-1}$) | $\kappa_{cat}$ ($s^{-1}$) | $\kappa_{cat}/K_m$ $mM^{-1}s^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|---|
| ArgI1 | $Ni^{2+}$ | 3.42 ±0.35 | 3452 ±125 | 26.24 ±0.97 | 7.826 ±0.010 |
| ArgI1 | $Mn^{2+}$ | 5.51 ±1.37 | 1228 ±119 | 9.48 ±0.92 | 1.765 ±0.004 |
| ArgI1 | $Co^{2+}$ | 4.90 ±0.63 | 1142 ±064 | 8.82 ±0.49 | 1.810 ±0.002 |

## 7. DISCUSIÓN

La arginasa ha sido estudiada en pocas especies bacterianas y la mayoría de los trabajos se han centrado en *H. pyilori* y el género *Bacillus*, por lo cual, el presente trajo se enfocó en la caracterización genética y bioquímica de la arginasa en *S. meliloti* Rm1021, un miembro de la familia *Rhizobiacea* que es capaz de fijar dinitrógeno atmosférico cuando se asocia de manera simbiótica con plantas del género *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*.

### 7.1 ArgI1 ES FUNCIONAL

La primera hipótesis en probar, fue si las dos posibles arginasas anotadas en el genoma de *S. meliloti* eran funcionales. Con base en la actividad de arginasa mostrada por la 6His-Sumo-ArgI1 sobreexpresada y purificada, aunado a la ausencia de la misma tanto en la 6His-Sumo-ArgI2 purificada como en el extraño total de la cepa 1021argI1, se demostró que únicamente ArgI1 era funcional. Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos por Flores-Tinoco et al. (2020), donde 6His-ArgI1 y 6His-ArgI2 sobreexpresadas y purificadas, muestran una actividad específica de arginasa de 0.38 y 0.01 $\mu$mol $min^{-1}$ $mg^{-1}$, respectivamente. La baja o nula actividad mostrada por ArgI2 en ambos trabajos podría ser explicada por dos razones.

En primera, la proteína tiene remplazados los residuos de His91 e His118 por Cys91 y Asn118, los cuales están involucrados en la coordinación de los átomos de metal. El cambio de His91 por Cys91 podría no ser tan drástico, ya que en *Z. mobilis* existe un residuo de Cys en la posición y en *H. pylori*, la His91 está orientado de forma incorrecta. En *Z. mobilis*, la Cys91 forma un enlace de coordinación con el átomo de $Zn_A^{2+}$, por medio del S de su grupo tiol, que se encuentra a una distancia de 2.302 Å (Hwangbo et al. 2019). Por otra parte, en *H. pylori*, el N$\delta^1$ de la His91, con el cual se debería formar el enlace de coordinación con el $Mn_A^{2+}$, está a una distancia de 4.276

Å, lo cual difiere de la arginasa de *B. caldovelox* y rata, que están a de 2.252 y 2.133 Å, respectivamente, haciendo imposible la formación del enlace (Bewley et al. 1999; Zhang et al. 2012). A pesar de que no existe un enlace entre la His91 y el $Mn_A^{2+}$ en *H. pylori*, es de importancia para la formación del centro bimetálico, que es necesario para una actividad enzimática optima, ya que su reemplazamiento por Ala91 resulta en la pérdida de un átomo de metal y el 91 % de su actividad (Srivastava et al. 2011). En cuanto al cambio del residuo de His118 por Asn118 en ArgI2, este podría tener un mayor impacto, ya que en *B. caldovelox*, *H. pylori* y *Z. mobilis*, el residuo forma un enlace de coordinación con el átomo de $MnA^{2+}$, y cuando es reemplazado en *H. pylori* por Ala118, la enzima es inactiva, aunque la causa es desconocida (Bewley et al. 1999; Zhang et al. 2012; 2013).

El segundo motivo por el cual la 6His-Sumo-ArgI2 no mostró actividad, se debe a que probablemente la enzima muestra menor afinidad a la L-Arg comparada con otros sustratos. Esta idea es derivada de los resultados de actividad enzimática con 6His-ArgI2 con L-Arg, Agm y guanidinobutirato, donde la actividad de arginasa fue un 400 y 200 % menor, respecto a la de agmatinasa y guanidinobutirasa (Flores-Tinoco et al. 2020).

## 7.2 FUNCIÓN DE ArgI1 EN VIDA LIBRE

Debido a que ArgI1 fue la única arginasa en 1021, la siguiente cuestión en determinar fue su función cuando el medio contenía L-Arg como única fuente de nitrógeno. Con base en los resultados obtenidos en la cinética de crecimiento, donde la cepa1021argI1 redujo tanto su $DO_{620}$ como su velocidad específica de crecimiento en un 68 y 78 %, respectivamente; se determinó que la arginasa es una enzima importante en el uso del aminoácido como fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas. Esto se debe a que a partir de la urea y la L-Orn se puede

generar amonio ($NH_3$), por medio de la ureasa (EC 3.5.1.) y ornitina ciclodemainasa (EC 4.3.1.12), respectivamente, el cual es una fuente de nitrógeno en bacterias (Dunn 2015). En *S. meliloti* AK631, se sabe que la expresión de la ureasa no depende de la concentración intracelular de urea, sino del nitrógeno en una forma asimilable, por lo que en bajas concentraciones del elemento se activa la expresión de los genes que codifican para la enzima (*ureA*, *ureB* y *ureC*), mientras que en presencia de amonio se reprimen (Miksch y Eberhardt 1994). En cuanto a la ornitina ciclodeaminasa, se sabe que *S. meliloti GR4* exhibe actividad para la enzima en el extracto total, cuando se utiliza L-Orn como fuente de carbono y nitrogeno, generando L-Pro y amonio, pero es idetectable cuando se utiliza manitol y L-Glu. La actividad tambien ha sido detectada en cepas como la 2011, de la cual deriva 1021 (Soto et al. 1994).

Por otra parte, el crecimiento residual mostrado por 1021argI1 podria deberse a la existencia de dos rutas alternativas en la degradación del aminoácido. La primera es la vía de la arginina deiminasa, cuya función en bacterias es la generación de ATP en condiciones de microanaerobiosis (Lu 2006), por lo que cuando se realizaron los ensayos de actividad enzimatica, los niveles de L-Cit fueron apenas de trazas (datos no mostrados), sugiriendo que bajo las condiciones analizadas no es responsable del crecimiento residual de la cepa 1021argI1. La segunda vía es la arginina decarboxilasa, cuya funcion es la generación de poliaminas, pero podria ser la respuesta al recrimiento residual en la cepa 1021ArgI1, debido a que los ensayos en dicha cepa utilizando L-Arg como fuente de nitrógeno obtuvo valores de 20 $nmol^{-1}$ mg $proteina^{-1}$. La descarboxilacion de la L-Arg produce Agm, la cual es transformada a Put y urea por la agmatinasa. La Put pude ser degradada hasta succinato en seis pasos posteriores, generando dos moléculas de amonio, adicionales a las dos generadas por la degradación de la

urea por la ureasa (Dunn 2015). Lo anterior difiere de los resultados encontrados en *E. coli*, donde la ruta contribuye únicamente con el 3 % del consumo de L-Arg bajo condiciones limitadas de nitrógeno y no produce amonio (Schneider et al. 1998).

## 7.3 INDUCCIÓN Y REGULACIÓN GENETICA DE *argI1*

La siguiente cuestión en analizar fue si la arginasa era inducida por la presencia de L-Arg exógena y el mecanismo genético que controla el proceso. Derivado de los ensayos de actividad enzimática en presencia de 1 mM de L-Arg o L-orn se demostró que la actividad de arginasa aumento 4.5 y 1.4 veces, respectivamente en 1021. Algo similar sucede con la arginasa de *B. subtilis*, la cual es inducida 6.9 veces por L-Arg exógena (Baumberg y Harwood 1978). Por otra parte, en *B. lichiniformis* la presencia tanto de L-Arg como de L-Orn en el medio, aumentan la actividad de arginasa en 115 y 96 veces, mientras que para *A. tumefaciens* el proceso es aún mayor, ya que los niveles de actividad superan los 400 órdenes de magnitud para ambos aminoácidos (Dessaux et al., 1986).

El mecanismo mediante el cual la L-Arg y L-Orn inducen la expresión de la arginasa ha sido ampliamente estudiado en *B. subtilis*, por lo que se sabe que la L-Arg generada por la biosíntesis o importada del medio por el transportador ArtRQP, así como la L-Orn generada por la biosíntesis o degradación de la L-Arg se unen a AhrC y RocR, respectivamente, induciendo la formación de hexámeros, que es la forma activa de ambas proteínas. Una vez que RocR es activada, puede reconocer las secuencias UAS y en conjunto con AhrC, mediante un mecanismo aún desconocido favorecen la unión del factor $\sigma^L$ a las secuencias -24 y -14 del promotor de los operones *roc*, al que pertenece la arginasa, induciendo su expresión (Zaprasis et al. 2014;

Hernandez et al. 2021). Este mecanismo no es extrapolable a *S. meliloti*, ya que no cuenta con ortólogos para RocR ni AhcR.

Por otra parte, en *E. coli* existen otro tipo de reguladores globales como los Lrp. Por estudios subsecuentes tanto en bacterias como en archeas, se determinó que existen proteínas similares a Lrp, que regulan la expresión de genes involucrados en distintos procesos fisiológicos, incluyendo el metabolismo de los aminoácidos (Brinkman et al. 2003). Un ejemplo de ello es HpdR, el cual regula de forma positiva a la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa (HpdA), involucrada en el catabolismo de la L-tirosina en *S. meliloti* (Loprasert et al. 2007). El contexto genético de *hpdR* y *hpdA*, es similar a *argIR* y *argI1*, ya que ambos reguladores se encuentran de manera divergente. Basados en los ensayos de actividad transcripcional con el promotor de *argI1* y la actividad de arginasa mostrada por la cepa 1021ArgIR en comparación con los de 1021, se determinó que ArgIR regula de manera positiva la expresión de *argI1* en presencia de L-Arg. Además, se demostró por medio de un ensayo de EMSA, que la regulación genética es directa, ya que la proteína 6His-Sumo-ArgIR se unió a la región intergénica comprendida entre -107 y -109 respecto al inicio de la traducción. Este fragmento contiene dos secuencias con un alto contenido de A y T, las cuales fueron identificadas por medio de la base de datos del RegulonDB v 10.5 (Santos-Zavaleta et al. 2019).

Por medio de ensayos de DNase footprinting y SELEX, con diferentes reguladores tipo Lrp y su secuencia diana, se ha llegado a la conclusión de que existen tres o cuatro bases conservadas, clave para la unión del regulador (3T, 5C, 8A y 13G) (Brinkman et al. 2003). Comparando las secuencias de unión de HpdR y las probables para ArgIR, se observó, que las primeras dos bases

están presentes en *S. meliloti*, mientras que las dos restantes han cambiado de 8A y 13G, por C en ambas posiciones para los dos reguladores.

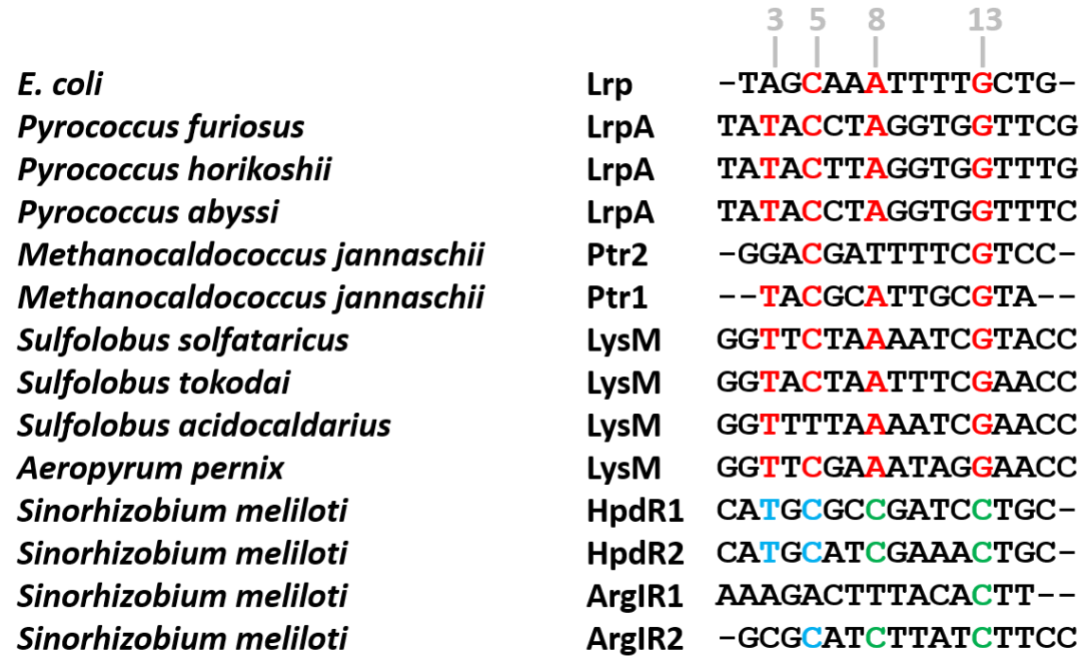


Figura 23. Secuencias de DNA para la unión de las proteínas tipo Lrp y las posibles para ArgIR. En color rojo se muestran las bases clave para la unión del regulador, en azul o verde las que se conservan o difieren en *S. meliloti* respecto a otras especies, pero que podrían ser clave para unión del regulador.

Por otra parte, la presencia de dos sitios de unión para HpdR y ArgIR, podría tener un efecto sinérgico en la en la unión al regulador y promover una mayor expresión del promotor, como sucede en *E. coli*, la cual cuenta con seis secuencias (Calvo et al., 1992).

## 7.4 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS

La siguiente parte del trabajo consistió en determinar algunas de las propiedades de la 6His-Sumo-ArgI1. El peso molecular fue de 33 kDa sin contar el péptido 6His-Sumo, lo cual es similar a otras arginasas bacterianas (Tabla 1). Hasta la fecha la arginasa de *B. caldovelox* ha sido la más pequeña con 31 kDa (Bewley et al. 1996; García et al. 2015; Patchett et al. 1991; Song et al.

2014), mientras que la de *H. pylori* la más grande con 38.2 kDa (McGee et al. 2004; Srivastava et al. 2010; Zhang et al. 2011). Con respecto a su estado oligomérico, la 6His-Sumo-ArgI1 formó trímeros como la arginasa de rata y Humano, pero difiere de la arginasa de *H. pylori*, *Z. mobilis* y *B. caldovelox*, las cuales usualmente se encuentran como monómeros, dímeros y dímeros de trímeros, respectivamente (Bewley et al. 1999; Zhang et al. 2012; Hwangbo et al. 2019).

Por otra parte, cuando la enzima fue evaluada con diferentes cationes metálicos divalentes a pH 8.0, se encontró que prefiere usar $Ni^{+2}$>$Mn^{+2}$>$Co^{+2}$. Esta promiscuidad en el uso de metales ha sido observada en la arginasa de *B. caldovelox* (Song et al. 2014), *B. anthracis* (Viator et al., 2008), *H. pilory* (Zhang et al. 2011), *Rummeliibacillus pycnus* (Huang et al. 2016) y *Entamoeba histolytica* (Mlik et al. 2018) por citar algunas. La habilidad en el uso de diferentes cationes metálicos es dada por las cadenas laterales de los residuos involucrados en la unión, capaces acomodar diversos metales con geometría de coordinación y propiedades electrónicas similares (Porde 2015). Además, cada uno de los cationes metálicos altera de manera distinta las propiedades de la enzima (Dauman et al. 2013), lo cual se observa en el presente trabajo, donde la actividad especifica más alta para el rango de pH 7.0 a 8.4 fue en presencia de $Ni^{2+}$, mientras que de 8.5 a 10.5 fue con $Mn^{2+}$. Algo similar sucede con la arginasa de *R. pycnus*, la cual muestra mayor actividad especifica en pH 6.5 en presencia de $Ni^{2+}$, mientras que en 9.5 fue con $Mn^{+2}$ (Huang et al. 2016), pero difiere de la de *H. pylori*, la cual muestra mayor actividad con $Co^{+2}$, tanto en pH 6.0 como pH 9.0 (Zhang et al. 2017).

En cuanto a los valores de los parámetros cinéticos, se observó que también son dependientes del metal utilizado como cofactor, ya que con $Ni^{2+}$ se necesitó en promedio un 48 % menos de sustrato, para alcanzar la mitad de la $V_{max}$, comparado con los otros dos metales evaluados. El

valor de la $K_{mL\text{-}Arg}$ es similar al de otras arginasas, como la de *B. caldovelox* (3.5 mM) (García et al. 2015) y *B. licheniformis* (2.17 mM) (Ramaley et al. 1966), pero difiere de la de *G. thermodenitrificans* (171.9 mM) (Huang et al. 2015), *H. pylori* (8.4 mM) (Zhang et al. 2011) y *B. thuringeiensis* (15.5 mM) (Zhang et al. 2013). Para el número de recambio ($k_{cat}$), el valor más alto fue con $Ni^{2+}$, pero es 11.4 y 25 veces más bajo que lo reportada para la arginasa 1 de humano (Stone et al. 2011) y la de *G. thermodenitrificans* (Huang et al. 2015), respectivamente. Por otra parte, la eficacia catalítica fue un 52 % más alta comparada con la de *G. thermodenitrificans* (Huang et al. 2015) y un 94 % más baja que la arginasa 1 de humano (Stone et al. 2010).

A pesar de que en condiciones *in vitro* la enzima muestra mejores parámetros cinéticos con $Ni^{2+}$ comparado con $Mn^{2+}$ y $Co^{2+}$, *in vivo* la utilización del metal está sujeta a su biodisponibilidad en el ambiente (Valdez et al. 2014). Por otra parte, la promiscuidad en el uso de diferentes cationes metálicos representa una ventaja evolutiva desde el punto de vista fisiológico para la sobrevivencia de la bacteria.

## 8. CONCLUSIONES

a) Los ensayos enzimáticos con el extracto total de la cepa 1021ArgI1, los cuales no mostraron actividad detectable de arginasa, aunados a la presencia de actividad con la proteína purificada SUMO-6His-ArgI1, concluyeron que ArgI1 es la única arginasa.

b) Los ensayos de cinética de crecimiento de la cepa 1021ArgI1, los cuales mostraron una reducción cuando se utilizó L-Arg como únicamente fuente de nitrógeno demostró que ArgI1 es importante en vida libre.

c) Los ensayos con el gen reportero *gusA* en la cepa 1021ArgIR, los cuales no mostraron cambios en la expresión de *argI1* en presencia o ausencia de L-Arg, demostraron que ArgIR regula de forma positiva la expresión de *argI1* cuando el aminoácido se encuentra en el medio.

d) Los ensayos de EMSA con la región intergénica de *argI1* y la proteína ArgIR, donde el regulador retardó el corrimiento del fragmento de DNA en el gel de poliacrilamida de en presencia o ausencia de L-Arg, demostraron que el regulador se une de forma directa a la secuencia de DNA río arriba del presunto promotor y que el aminoácido no tuvo un efecto en la afinidad.

e) Los ensayos de cinética de crecimiento de la cepa 1021ArgIR, los cuales son similares a la cepa 1021 cuando se utiliza L-Arg como fuente de nitrógeno, demostraron que el regulador no es importante en vida libre bajo dichas condiciones.

f) Los ensayos de actividad enzimática con diferentes cationes divalentes en la proteína purificada SUMO-6His-ArgI1, demostraron que

## 9. RECOMENDACIONES

a) Realizar ensayos de nodulación y fijación de nitrógeno utilizando las cepas 1021ArgI1 y 1021ArgIR en plantas de alfalfa, para determinar el efecto de la ausencia de cada uno de los genes.

b) Corroborar la secuencia de DNA de unión de ArgIR determinada en la base de datos del RegulonDB, por medio de un ensayo de DNAsa footprinting.

MICROBIOLOGY

RESEARCH ARTICLE
Ide *et al.*, *Microbiology* 2020;166:484–497
DOI 10.1099/mic.0.000909

MICROBIOLOGY SOCIETY

# Genetic regulation, biochemical properties and physiological importance of arginase from *Sinorhizobium meliloti*

Alejandra Arteaga Ide[1], Victor M. Hernández[1], Liliana Medina-Aparicio[2], Edson Carcamo-Noriega[3], Lourdes Girard[4], Ismael Hernández-Lucas[2] and Michael F. Dunn[1,*]

**Abstract**

In bacteria, L-arginine is a precursor of various metabolites and can serve as a source of carbon and/or nitrogen. Arginine catabolism by arginase, which hydrolyzes arginine to L-ornithine and urea, is common in nature but has not been studied in symbiotic nitrogen-fixing rhizobia. The genome of the alfalfa microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021 has two genes annotated as arginases, *argI1* (*smc03091*) and *argI2* (*sma1711*). Biochemical assays with purified ArgI1 and ArgI2 (as 6His-Sumo-tagged proteins) showed that only ArgI1 had detectable arginase activity. A 1021 *argI1* null mutant lacked arginase activity and grew at a drastically reduced rate with arginine as sole nitrogen source. Wild-type growth and arginase activity were restored in the *argI1* mutant genetically complemented with a genomically integrated *argI1* gene. In the wild-type, arginase activity and *argI1* transcription were induced several fold by exogenous arginine. ArgI1 purified as a 6His-Sumo-tagged protein had its highest *in vitro* enzymatic activity at pH 7.5 with $Ni^{2+}$ as cofactor. The enzyme was also active with $Mn^{2+}$ and $Co^{2+}$, both of which gave the enzyme the highest activities at a more alkaline pH. The 6His-Sumo-ArgI1 comprised three identical subunits based on the migration of the urea-dissociated protein in a native polyacrylamide gel. A Lrp-like regulator (*smc03092*) divergently transcribed from *argI1* was required for arginase induction by arginine or ornithine. This regulator was designated ArgIR. Electrophoretic mobility shift assays showed that purified ArgIR bound to the *argI1* promoter in a region preceding the predicted *argI1* transcriptional start. Our results indicate that ArgI1 is the sole arginase in *S. meliloti*, that it contributes substantially to arginine catabolism *in vivo* and that *argI1* induction by arginine is dependent on ArgIR.

## INTRODUCTION

L-arginine is a versatile amino acid that fulfills structural and catalytic functions in proteins [1, 2] and serves as a nitrogen storage molecule [3]. The non-proteogenic amino acid L-ornithine is an intermediate in arginine biosynthesis and can also be derived from arginine catabolism (Fig. 1) [4, 5]. Ornithine is a component of ornithine-containing lipids [6] and some peptidoglycans [7] and siderophores [8], and is a precursor of the polyamine putrescine [9].

Rhizobia are Gram-negative bacteria that engage in a nitrogen-fixing endosymbiosis with leguminous plants, which in agricultural settings reduces the need for chemical fertilizers. Rhizobial species have been studied intensively for their ability to induce the formation of specialized structures called nodules on the roots of their host plants. Within plant cells of the nodules, rhizobia differentiate into metabolically specialized forms called bacteroids and reduce atmospheric nitrogen to ammonia. The ability of rhizobia to synthesize

Received 17 December 2019; Accepted 10 March 2020; Published 27 March 2020
**Author affiliations:** [1]Programa de Genómica Funcional de Procariotes, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico; [2]Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico; [3]Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico; [4]Programa de Biología de Sistemas y Biología Sintética, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, Mexico.
***Correspondence:** Michael F. Dunn, mike@ccg.unam.mx
**Keywords:** arginase; L-arginine; L-ornithine; Lrp family regulator; divalent metal cofactor.
**Abbreviations:** μ, specific growth rate (generations $h^{-1}$); Ap, ampicillin; ArgI1, arginase 1; ArgI2, arginase 2; ArgIR, arginase regulator; BSA, bovine serum albumin; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; Gm, gentamicin; Gus, ß-glucuronidase; *gusA*, gene encoding ß-glucuronidase; Km, kanamycin; LB, Luria broth; Lrp, leucine-responsive protein; MMS-Arg, minimal medium succinate-arginine; MMS-$NH_4$, minimal medium succinate-ammonium; MMS-Orn, minimal medium succinate-ornithine; Nal, nalidixic acid; Nm, neomycin; Ocd, ornithine cyclodeaminase; OD, optical density; Odc*, ornithine cyclodeaminase pseudogene; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; pSyma, symbiotic plasmid a; Sm, streptomycin; Sp, spectinomycin.
Supplementary material is available with the online version of this article.

000909 © 2020 The Authors

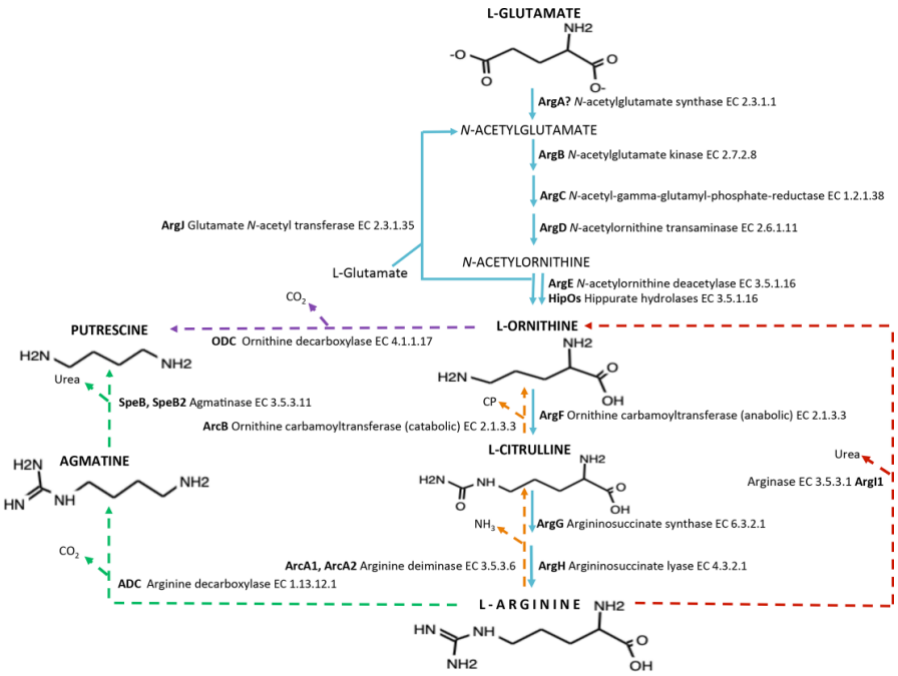


**Fig. 1.** Pathways and key intermediates of arginine metabolism in *S. meliloti*. The biosynthesis pathway is shown in aqua-coloured solid lines and features multiple enzymes that can convert *N*-acetylornitine to ornithine [13]. The arginine and ornithine catabolic pathways are shown with dashed lines: arginase (red, this work); arginine deiminase (orange [35]); arginine decarboxylase (green [17]; ornithine decarboxylase (purple [17]). CP, carbamoyl phosphate.

certain amino acids, including ornithine, is essential for their free-living growth and the establishment of an effective symbiosis [10]. Ornithine auxotrophs of the nitrogen-fixing *Medicago* microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* are unable to form an effective symbiosis [11, 12]. In *S. meliloti*, ornithine can be derived from arginine biosynthesis or from arginine degradation by arginase or by the arginine deiminase pathway (Fig. 1) [10, 13]. Enzymes of the *S. meliloti* arginine deiminase pathway are induced by microaerobiosis, although not in symbiosis [14, 15], and null mutants in genes encoding either of the first two enzymes of the pathway formed normal symbioses with alfalfa [16]. Two potential arginases (one chromosomal and one located on pSyma) are encoded in the *S. meliloti* 1021 genome, but neither has been characterized. We reported preliminary observations that aerobically grown *S. meliloti* 1021 cells contained a high arginase activity that was further increased in the presence of exogenous arginine [10]. The existence of multiple enzymes catalyzing ornithine production from *N*-acetylornithine in the biosynthetic pathway, along with the presence of the highly active arginase, led us to suggest that *S. meliloti* had a high metabolic capacity for ornithine production (Fig. 1) [10, 13]. By characterizing the arginases in *S. meliloti*, we hoped to determine whether both were active, the kinetic properties of the purified enzyme(s), characteristics of the induction of arginase activity and the physiological importance of the enzyme(s). Here we report that only the chromosomal arginase (ArgI1) is catalytically active and that a Lrp-like transcriptional regulator is required for the induction of the encoding gene by arginine. We determined that purified ArgI1 has a metal cofactor preference of $Ni^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+}$ and that its pH activity profile differs depending on which divalent cation is provided to the enzyme. Finally, ArgI1 activity is important for the utilization of arginine as a sole nitrogen source.

## METHODS

### Bacterial strains, plasmids and culture growth conditions

The bacterial strains and plasmids are listed in Table 1. Luria broth (LB) complex medium and MMS-$NH_4$ minimal medium with 10 mM each of succinate and $NH_4Cl$ as carbon and nitrogen sources, respectively, have been described previously [13]. MMS-Arg and MMS-Orn media contained 10 mM L-arginine or L-ornithine, respectively, in place of $NH_4Cl$. Amino acid supplements were prepared as 0.5 M stocks, adjusted to pH 6.8 and filter-sterilized. *S. meliloti* strains were grown as described previously [17], except that LB medium was used for precultivation. Specific growth rates

**Table 1.** Strains and plasmids used in this study

| Strain or plasmid | Relevant characteristics | Source or reference |
|---|---|---|
| ***E. coli* strains** | | |
| BL21(DE3) | Strain for protein expression | Invitrogen |
| DH5α | Strain for cloning work | Laboratory collection |
| JM109 | Strain for cloning work | Laboratory collection |
| Hps1 | F−Δ(*lac-proAB*) *endA1 gyrA96 hsdR17 supE44 relA1 recA1 thi* Rif$^{s}$ *zzx*::mini-Tn*5*Lac4 | [65] |
| HB101 | Strain for cloning work | Laboratory collection |
| ***S. meliloti* strains** | | |
| 1021 | Sm$^{r}$ derivative of wild-type strain SU47, Sm$^{r}$ Nal$^{r}$ | [66] |
| 1021argI1 | 1021 *argI1*::*loxP* Sp *argI1* null mutant, Sm$^{r}$ Nal$^{r}$ Sp$^{r}$ | This study |
| 1021argIR | 1021 *argIR*::*loxP* Sp *argIR* null mutant, Sm$^{r}$ Nal$^{r}$ Sp$^{r}$ | This study |
| 1021argI1(argI1) | 1021 *argI1*::*loxP* Sp *argI1* null mutant complemented with the *argI1* gene integrated into pSyma, Sm$^{r}$ Nal$^{r}$ Sp$^{r}$ Gm$^{r}$ | This study |
| 1021argIR(argIR) | 1021 *argIR*::*loxP* Sp *argIR* null mutant complemented with the *argIR* gene integrated into pSyma, Sm$^{r}$ Nal$^{r}$ Sp$^{r}$ Gm$^{r}$ | This study |
| **Plasmids*** | | |
| pBBR1MCS-53 | Δ*placZ* pBBR1MCS-5 derivative with promoterless *gusA*, Gm$^{r}$ | [24] |
| pBB53argI1::gusA | Transcriptional *argI1*::*gusA* fusion in pBBR1MCS-53 | This study |
| pBB53argI2::gusA | Transcriptional *argI2*::*gusA* fusion in pBBR1MCS-53 | This study |
| pBB53argIR::gusA | Transcriptional *argIR*::*gusA* fusion in pBBR1MCS-53 | This study |
| pTopo-argI1 | 1021 genome region containing *argI1* cloned in pCR2.1-TOPO | This study |
| pTopo-argIR | 1021 genome region containing *argIR* cloned in pCR2.1-TOPO | This study |
| pK-argI1::loxSp | 1021 genome region containing *argI1*::*loxP* Sp cloned in pK18**mobsacB*, Sp$^{r}$, Km$^{r}$ | This study |
| pK-argIR::loxSp | 1021 genome region containing *argIR*::*loxP* Sp cloned in pK18**mobsacB*, Sp$^{r}$, Km$^{r}$ | This study |
| pK18**mobsacB* | Broad-host range gene replacement vector, Km$^{r}$ | [22] |
| pMS102loxSp17 | Source of the *loxP* Sp interposon, Sp$^{r}$ element | [21] |
| pRK2013 | Helper plasmid, Km$^{r}$ | [67] |
| pRK600 | Helper plasmid, Cm$^{r}$ | [68] |
| pET SUMO | Expression vector for production of 6His-Sumo-tagged proteins, Km$^{r}$ | Invitrogen |
| pSumo-argI1 | pET SUMO containing the cloned 1021 *argI1* gene Km$^{r}$ | This study |
| pSumo-argIR | pET SUMO containing the cloned 1021 *argIR* gene Km$^{r}$ | This study |
| pSumo-argI2 | pET SUMO containing the cloned 1021 *argI2* gene, Km$^{r}$ | |
| pCR2.1-TOPO | Vector for cloning PCR products, Km$^{r}$ | Invitrogen |
| pUC18-mini-Tn*7*T | pUC1 with mini-Tn*7* transposon, Ap$^{r}$ | [23] |
| pTn*7*T-argI1 | pUC18-mini-Tn*7*T containing *argI1* gene, Ap$^{r}$ | This study |
| pTn*7*T-argI1R | pUC18-mini-Tn*7*Tcontaining *argIR* gene, Ap$^{r}$ | This study |
| pUX-BF13 | Helper plasmid providing the Tn*7* transposition functions *in trans*, Ap$^{r}$ | [69] |

(μ, generations $h^{-1}$) were calculated from culture $OD_{620}$ values obtained between 4 and 12 h [17]. When required, antibiotics were used at the following concentrations (μg $ml^{-1}$): nalidixic acid (Nal), 20; gentamicin (Gm), 15; kanamycin (Km), 50; neomycin (Nm), 60; spectinomycin (Sp), 100; streptomycin (Sm), 200; ampicillin (Ap), 100. Standard protocols were used to grow *Escherichia coli* for genetic manipulations [18].

### DNA manipulations and sequence analysis

Standard methods were used for DNA isolation, restriction digestions, cloning and transformation [18]. Bacterial triparental conjugations were performed as described previously [13]. High-stringency DNA hybridizations were performed as described previously [13] or with a DIG-High Prime DNA Labeling kit (Roche). Gene nucleotide and deduced amino acid sequences were obtained from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). Searches for gene orthologues and their genomic contexts was performed with the Tree Browser function of Microbes Online (http://meta.microbesonline.org/). Gene transcriptional start sites were predicted with the BDGP program (https://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) [19]. The Softberry BPROM program (http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb) was used to predict −10 and −35 boxes in promoter sequences [20].

### PCR amplifications

The primers (Table S1, available in the online version of this article) were used in PCR reactions with Accuprime *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) to clone genes for the construction of transcriptional fusions or whose products were to be overexpressed and purified, or with Dream *Taq* PCR Master Mix (Thermo Fisher) for other purposes. PCR cycling programmes 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 performed at 72 °C for 10 min.

### Recombinant protein purification

*S. meliloti* genes *argI1*, *argI*2 and *argIR* were amplified by PCR and cloned in pET SUMO (Invitrogen) to generate plasmids pSumo-argI1, pSumo-argI2 and pSumo-argIR (Table 1). To overexpress the products of the cloned genes as N-terminal 6His-Sumo-tagged proteins, the plasmids were transformed into *E. coli* BL21(DE3) and the resulting strains 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 mM and cultures were grown for 6 h. 6His-Sumo-tagged proteins were purified using Ni-NTA agarose under native conditions as recommended by the manufacturer (Invitrogen). Recombinant proteins eluted with imidazole were exchanged into 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM 2-mercaptoethanol (pH 8.0) by gel filtration chromatography on a Sephadex G-50 column.

### Mutant construction

The insertional inactivation of genes in *S. meliloti* was performed as described previously [13]. Briefly, genome regions encoding *argI1* (*smc03091)* and *argIR (smc03092)* were amplified by PCR and cloned into pCR2.1TOPO (Invitrogen) to produce plasmids pTopo-argI1 and pTopo-argIR (Table 1). Following verification by restriction enzyme analysis, the inserts from pTopo-argI1 and pTopo-argIR were digest with *Sal*I and *Cla*I, respectively, and the *lox*Sp interposon from pMS102*lox*Sp17 [21]inserted to give pCR-argI1::loxSp and pCR-argIR::loxSp. The interrupted genes were excised with *Eco*RI and ligated into suicide vector pK18**mobsacB* [22] to generate plasmids pKargI1::loxSp and pKargIR::loxSp respectively (Table 1). These plasmids were introduced into *S. meliloti* 1021 by triparental mating and a $Sp^r$, $Nm^s$ single recombinant obtained from each mating was spread on LB containing Sm, Sp and 12 % sucrose to allow the selection of the *argI1* and *argIR* null mutants. The correct construction of the mutants was confirmed by Southern hybridization. Mutants 1021argI1 and 1021argIR were used for further studies.

### Genetic complementation of mutants

Genetic complementation of the 1021argI1 and 1021argIR mutants was performed using the Tn7 transposition method, which provides a stable single-copy integration of the complementing gene into the genome at the *att*Tn7 site downstream of the highly conserved *glmS* gene [23]. *S. meliloti* has one chromosomal and one pSyma-encoded *glmS* gene, and the integration of complementing genes into pSyma was performed as follows. To construct plasmids pTn7T-argI1 and pTn7T-argI1R (Table 1), the *argI1* and *argIR* genes with their promoters were amplified using the primer pairs argI1Xho1-F/argIHind3-R and argIRBamH1-F/Hind3-R, respectively (Table S1) and cloned into pCR2.1TOPO and sequenced. The restriction sites introduced by the forward and reverse primers (Table S1) were used to insert the genes into plasmid pUC18-mini-Tn7T. Plasmids were transformed into *E. coli* Hps1 by triparental mating, and transformants were isolated by streaking on LB medium with appropriate antibiotics. The correct plasmid construction was verified by restriction enzyme digestion. Hps1/pTn7T-argI1 and Hps1/pTn7T-argIR (Table 1) were used in separate tetraparental matings with 1021*argI1* or 1021*argIR*, HB101/pRK600 (delivery plasmid) and DH5α/pUX-BF13 (helper plasmid). The resulting 1021argI1(argI1) and 1021argIR(argIR) complemented strains were selected on PY Gm and analysed by PCR with the primers glms Tn5-F and glms Tn5-R (Table S1) to confirm the insertion of the complementing gene upstream of the pSyma *glmS* homologue.

### Construction of transcriptional fusions with the ß-glucuronidase (*gusA*) gene

The PCR primers used to clone the promoter and 5′ coding region of the genes for the construction of the transcriptional fusion are described in Table S1. A 310 bp fragment containing 132 bp of the *argI1* coding region, the entire 155 bp *argI1–argIR* intergenic region and 23 bp of the *argIR* coding region was amplified and cloned in the broad-host range plasmid pBBR1MCS-53 [24], with the *argI1* coding

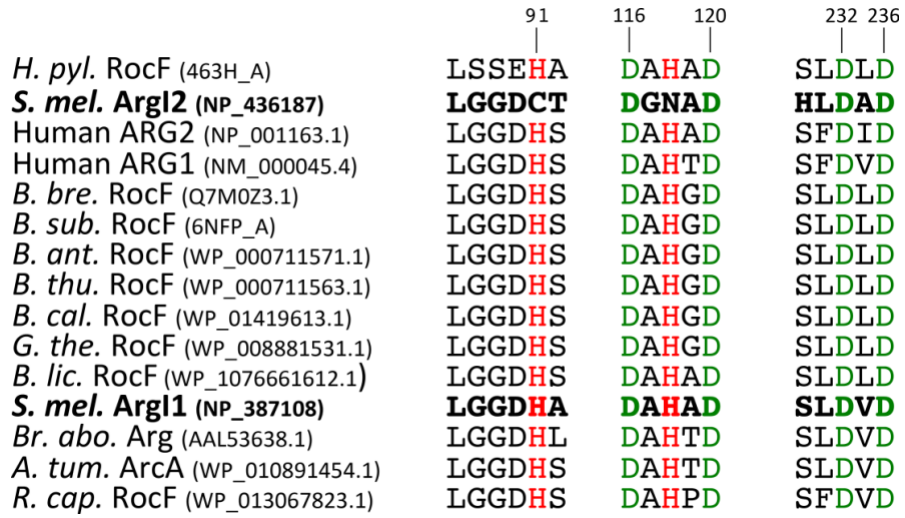


**Fig. 2.** Multiple sequence alignment of arginases showing residues involved in divalent metal ion binding [31]. Key His (H) and Asp (D) residues are shown in red and green, respectively. Amino acid residue numbers correspond to the *H. pylori* arginase. The *S. meliloti* ArgI1 and ArgI2 sequences are in boldface. *H. pyl., H. pylori*; *S. mel., S. meliloti*; *B. bre., Bacillus brevis*; *B. sub., Bacillus subtilis*; *B. ant., Bacillus anthracis*; *B. thu., Bacillus thuringiensis*; *B. cal., Bacillus caldovelox*; *G. the., Geobacillus thermodenitrificans*; *B. lic., Bacillus liceniformis*; *Br. abo., Brucella abortus*; *A. tum., A. tumefaciens*; *R. cap., Rhodobacter capsulatus*.

sequence in the same orientation as the promoterless *gusA* (*uidA*) gene in the vector, to generate the plasmid pBB53-argI1::gusA. The pBB53-argIR::gusA construct had the 310 bp fragment cloned in the opposite orientation, putting the *argIR* promoter region in the same transcriptional orientation as *gusA*. The correct transcriptional orientations of the fusion plasmids was confirmed by restriction enzyme digestion and PCR reactions with primer p53lw (reverse primer specific for *gusA*) and the forward primer for the relevant *S. meliloti* gene [13].

### ß-glucuronidase (Gus) assays of transcriptional fusions

Experimental cultures were grown in the desired minimal medium for 16 h at 30 °C with shaking at 200 r.p.m. Gus activity was determined by measuring the production of *p*-nitrophenol from the *p*-nitrophenyl ß-D-glucuronide substrate with quantitation based on total protein [13]. Values are the mean±SD for three independent experiments. One unit (U) of activity is defined as the production of 1 nmol of product $min^{-1}$ mg $protein^{-1}$.

### 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 16 h at 30 °C, 200 r.p.m. Cells were harvested at 5500 ***g*** for 5 min and protein extracts were obtained by sonication as described previously [13]. Protein concentrations were determined by the Bradford method [25].

### Enzyme assays

Arginase was assayed in 100 µl reactions containing 100 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), 1 mM reduced glutathione, 0.2 mM $MnCl_2$ and 10 mM L-arginine. Reactions were started by adding protein (10 µg of total protein from whole-cell extracts or 0.8 µg of purified 6His-sumo-ArgI1or 6His-sumo-ArgI2) and incubated at 30 °C. Ornithine formation was quantified by the colorimetric assay of Vogel and Bonner [26] based on an ornithine standard curve. Arginine deiminase was determined by measuring citrulline produced from arginine as described by Lindqvist [27]. Arginine decarboxylase activity was measured using L-[$^{14}$C(U)]-arginine in place of L-[1-$^{14}$C]-ornithine substrate in the assay described for ornithine decarboxlyase [17].

### Effect of different metal cofactors and pH on arginase activity

The effect of the metal ion cofactor on purified 6His-Sumo-ArgI1 activity was determined in reactions where the $MnCl_2$ cofactor used in the standard arginase activity assay was replaced with an equimolar amount of the chloride salts of $Ni^{2+}$, $Co^{2+}$, $Zn^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Ba^{2+}$, $Cd^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Cu^{2+}$, or $Mg^{2+}$. The effect of pH on purified 6His-Sumo-ArgI1 activity was determined in reaction mixtures buffered with Tris-HCl at a 100 mM final concentration in the range of pH 7–10.5.

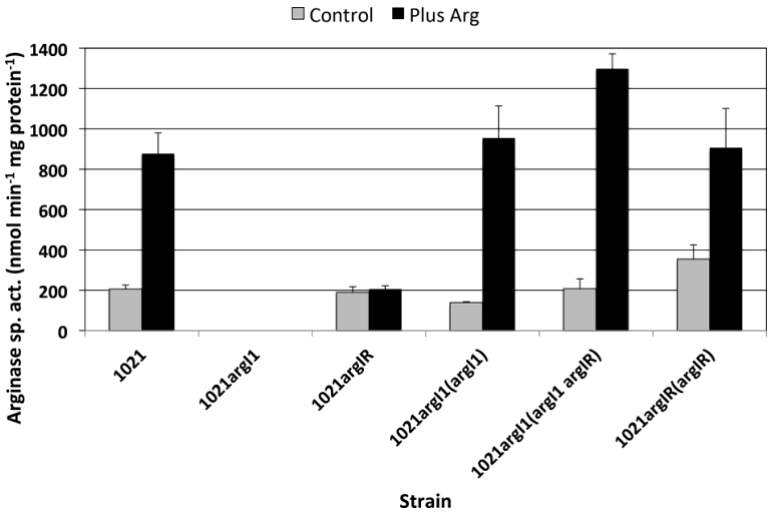


**Fig. 3.** The effect of exogenous arginine on arginase sp. act. (nmol $min^{-1}$ mg $protein^{-1}$) in *S. meliloti* wild-type 1021 and the 1021argI1 and 1021argIR null mutants and their genetically complemented derivatives. Control (grey bars) denotes strains grown in MMS-$NH_4$; Plus Arg (black bars) represents strains grown in MMS-$NH_4$ containing 1 mM L-arginine. Activities were determined in cells from 16 h cultures and are the mean±SD for at least three independent experiments.

### Determination of arginase kinetic parameters and subunit composition

The Michealis–Menten constants ($K_m$) and maximal velocity ($V_{max}$) of purified 6His-Sumo-ArgI1 were determined with the standard arginase assay containing 0.16, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5, 5, 7.5, 10 or 15 mM arginine. Kinetic values were calculated as described by Bisswanger [28]. Reactions were performed in triplicate and the values presented are the mean±SD for three independent experiments. The oligomeric state of the 6His-Sumo-ArgI1 was evaluated by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) as described by Garfin [29] with modifications as follows. Ten microgram samples of purified 6His-Sumo-ArgI1 were incubated for 2 h at room temperature in 20 µl of loading buffer without SDS and 2-mercaptoethanol but containing 0, 1, 2, 3, 4 or 5 M urea. An additional sample was heated at 95 °C for 5 min in sample buffer containing SDS and 2-mercaptoethanol to fully denature the 6His-Sumo-ArgI1. Samples were analysed in 0.75 mm thick PAGE gels composed of a 12% resolving and 7% stacking gel. SDS was omitted from the gels and running buffer. Gels were run at constant voltage (120 V) for 90 min at room temperature and stained with Coomasie brilliant blue to visualize the 6His-Sumo-ArgI1 oligomers and monomers.

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

EMSAs were performed according to the protocol previously described [30]. DNA fragments F1 and F2 were obtained by PCR using proargI1LFT-F/proargI1RGT-R or proargI1LFT-F/proargI1LFT-R primers, respectively (Table S1). The 190 bp F1 fragment contains the entire *argI1* 5′ intergenic region (155 bp) and 34 bp of the *argIR* coding region. The 107 bp F2 fragment harbours nt −1 to −107 relative to the *argI1* translational start codon. The DNA regions (100 ng) were mixed with increasing concentrations of purified 6His-Sumo-ArgIR protein in binding buffer [100 mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA, 250 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 62.5% (v/v) glycerol, 500 mg $ml^{-1}$ BSA and 0.5 mM DTT]. The mixture was incubated for 20 min at room temperature and then separated by electrophoresis in 5% native polyacrylamide gels in 0.5X Tris-borate-EDTA buffer at 70 V. The DNA bands were visualized by ethidium bromide staining.

## RESULTS

### Sequence characteristics of the *S. meliloti* arginases ArgI1 and ArgI2 and taxonomic distribution of orthologues

Two genes for putative arginases are annotated in the *S. meliloti* 1021 genome: *argI1* (*smc03091*) located on the chromosome and *argI2* (*sma1711*) encoded on pSymA. The deduced protein products of *argI1* and *argI2* are 307 and 297 amino acids, respectively, and have 27.1 and 43.6% amino acid identity and similarity, respectively. A search for proteins similar to ArgI1 revealed that orthologues are present in the alphaproteobacterial families *Rhizobiaceae*, *Brucellaceae*, *Rhodospirillaceae* and *Rhodobacteraceae*. In the *Rhizobiaceae*, the *S. meliloti* 1021 and *Sinorhizobium medicae* WSM419 ArgI1 orthologues are flanked by a divergently transcribed Lrp family transcriptional regulator and PhnB (antibiotic resistance) on one side, and genes related to chemotaxis on

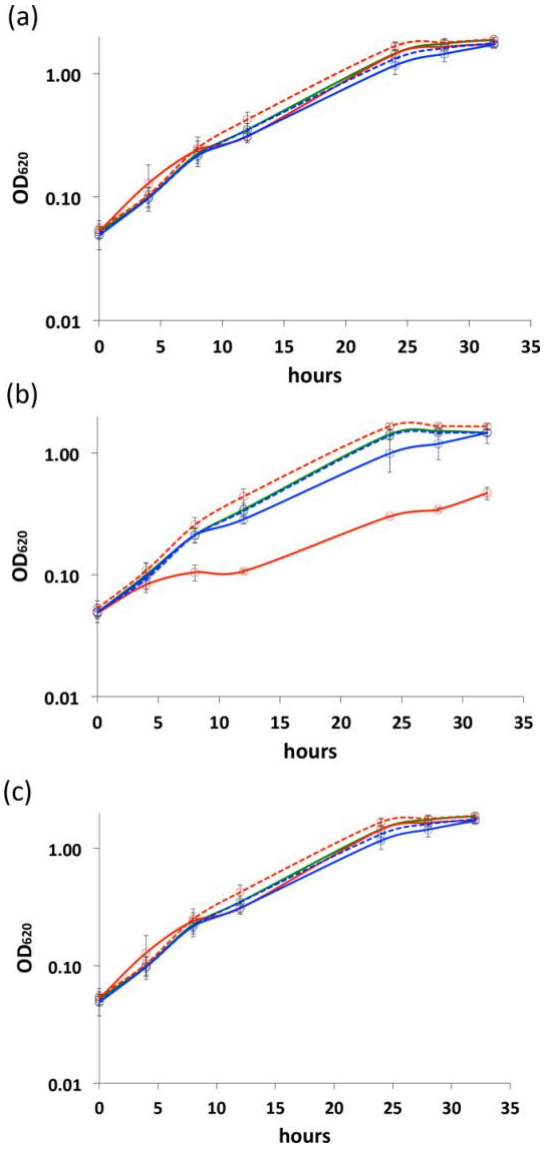


**Fig. 4.** Growth kinetics of *S. meliloti* strains in minimal medium with succinate as carbon source and, as nitrogen source, ammonium (MMS-$NH_4$), panel (a); arginine (MMS-Arg), panel (b); or ornithine (MMS-Orn), panel c. 1021 wild-type, green lines; 1021argI1 mutant, red lines; 1021argIR mutant, blue lines; 1021argI1(argI1) complemented mutant, red broken lines; 1021argIR(argIR) complemented mutant, blue dashed lines. Values are the mean±SD for three independent experiments.

the other side. No additional genes related to ornithine or arginine metabolism are present in the vicinity. The gene arrangement in *Sinorhizobium fredii* NGR234 is similar, except that a RocD (ornithine aminotransferase) is encoded immediately following the ArgI1 orthologue, and this is followed by various chemotaxis genes. *Agrobacterium radiobacter* K84 has a similar gene arrangement to *S. fredii*, except for lacking PhnB. *Agrobacterium tumefaciens* C58 encodes one ArgI1 orthologue on the linear chromosome and one on the Ti plasmid: the chromosomal orthologue is divergently orientated to a Lrp family regulator and immediately followed by a ornithine cyclodeaminase (Ocd*) pseudogene. The Ti plasmid ArgI1 orthologue encoding gene is flanked by genes for nopaline and octopine metabolism as well as an Ocd (this, and the Ocds described below, are not pseudogenes). *Mesorhizobium loti* MAFF303099 has the gene order Lrp family regulator/divergent *argI1*/*ocd*, as does *Azospirillum* sp. B510 (*Rhodospirillaceae*) and *Brucella suis* 1330 (*Brucellaceae*). Among members of the *Rhodobacteraceae* the Lrp family regulator/*argI1*/*ocd* gene order occurs in multiple species, including *Sphingomonas wittichii* RW1, *Stappia aggregata* IAM 12416, *Methylobacterium nodulans* ORS 2060, *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17025 and *Paracoccus denitrificans* PD12222.

ArgI2 orthologue-encoding genes are present in *S. medicae* WSM419 and many other Sinorhizobia, *Burkholderia dolosa* AU158 (betaproteobacteria) and *Pseudomonas entomophila* L48 (gammaproteobacteria). Orthologues appear in actinobacterial (Gram-positive) organisms such as *Salinispora tropica*, *Kribbella flavida* and various streptomycetes. No gene synteny occurs around the ArgI2 orthologues in these genomes.

Two histidine and 4 aspartic acid residues are conserved in arginases and are essential for metal ion binding and catalytic activity (Fig. 2) [31]. The deduced amino acid sequence of the *S. meliloti* ArgI1 contains all six of these key residues, while ArgI2 lacks both of the histidine residues.

### *S. meliloti* ArgI1 is enzymatically active and is required for full growth with arginine as nitrogen source

To determine the enzymatic functionality of the two arginases annotated in the *S. meliloti* genome sequence, the genes for both were cloned, overexpressed as 6His-Sumo-tagged proteins and purified by nickel affinity chromatography. In the standard arginase assay described in the Methods section, the 6His-Sumo-ArgI1 had a specific activity of 2552±126 nmol L-ornithine $min^{-1}$ mg $protein^{-1}$ (mean±SD for duplicate cultures). The 6His-Sumo-ArgI2 protein had no detectable activity.

To define the role of ArgI1 in the growth of *S. meliloti*, we generated an *argI1* null mutant (1021argI1) and a genetically complemented version of it, strain 1021argI1(argI1) (Table 1). Arginase activity assays on cells of these strains and the wild-type grown in the absence and presence of exogenous arginine (1 mM) showed that 1021argI1 lacked detectable

**Table 2.** Specific growth rates of *S. meliloti* strains in minimal medium MMS with ammonium, arginine or ornithine as nitrogen source. Values were calculated from the data shown in Fig. 4

| Strain | Condition and specific growth rate (μ)* | | |
|---|---|---|---|
| | MMS-$NH_4$ | MMS-Arg | MMS-Orn |
| 1021 | 0.155 | 0.155 | 0.157 |
| 1021 *argI1* | 0.174 (1.12) | 0.032 (0.21) | 0.109 (0.69) |
| *1021 argIR* | 0.164 (1.06) | 0.135 (0.87) | 0.145 (0.92) |
| 1021 *argI1*(*argI1*) | 0.187 (1.21) | 0.175 (1.13) | 0.176 (1.12) |
| 1021 *argIR*(*argIR*) | 0.172 (1.11) | 0.161 (1.04) | 0.157 (1.0) |

*For each column, values in parenthesis are normalized to those of the wild-type set at unity.

arginase activity under either condition (Fig. 3). In contrast, the wild-type and 1021argI1(argI1) strains had easily detectable arginase activities that increased several fold when cells were grown with exogenous arginine. The growth kinetics and specific growth rates (μ, generations $h^{-1}$) of these strains were determined in minimal media containing ammonium (MMS-$NH_4$), arginine (MMS-Arg) or ornithine (MMS-Orn) as sole nitrogen source. The 1021 wild-type, 1021argI1 mutant and 1021argI1(argI1) complemented strain had similar growth kinetics in MMS-$NH_4$ (Fig. 4a), where the specific growth rates of the mutant and complemented mutant were 1.1- and 1.2-fold higher than wild-type (Table 2). In MMS-Arg, the *argI1* mutant grew significantly slower and reached a two-thirds lower final $OD_{620}$ (Fig. 4b). The specific growth rate of the *argI1* mutant was only 21% that of the wild-type (Table 2). In contrast, the genetically complemented 1021argI1(argI1) strain grew moderately better and had a slightly higher growth velocity than the wild-type in MMS-Arg (Fig. 4b, Table 2). In MMS-Orn the 1021argI1 mutant specific growth rate was 69% that of the wild-type. The genetically complemented 1021argI1(argI1) strain grew slightly better than wild-type in MM-Orn (Fig. 4c, Table 2).

To detect enzymatic activities that might explain the residual growth of the 1021argI1 mutant in MMS-Arg (Fig. 4b) we assayed for arginine deiminase and arginine decarboxylase in the wild-type and mutant grown in that medium. We obtained specific activities of about 20 nmol $min^{-1}$ mg $protein^{-1}$ for arginine decarboxylase in both strains, while the results for the arginine deiminase assay revealed trace levels near the limit of detection of our assay (results not shown).

### *argI1* gene expression increases in cells grown with exogenous arginine or ornithine

We determined the effect of exogenous arginine and ornithine on *argI1* expression using a plasmid-borne *argI1::gusA* transcriptional fusion (pBB53argI1::gusA). ß-glucuronidase (Gus) activity measurements of *S. meliloti* strains containing the fusion plasmid were determined after their growth in MMS-$NH_4$ without (control) or with exogenous arginine or ornithine (1 mM final concentration) (Fig. 5). Assays

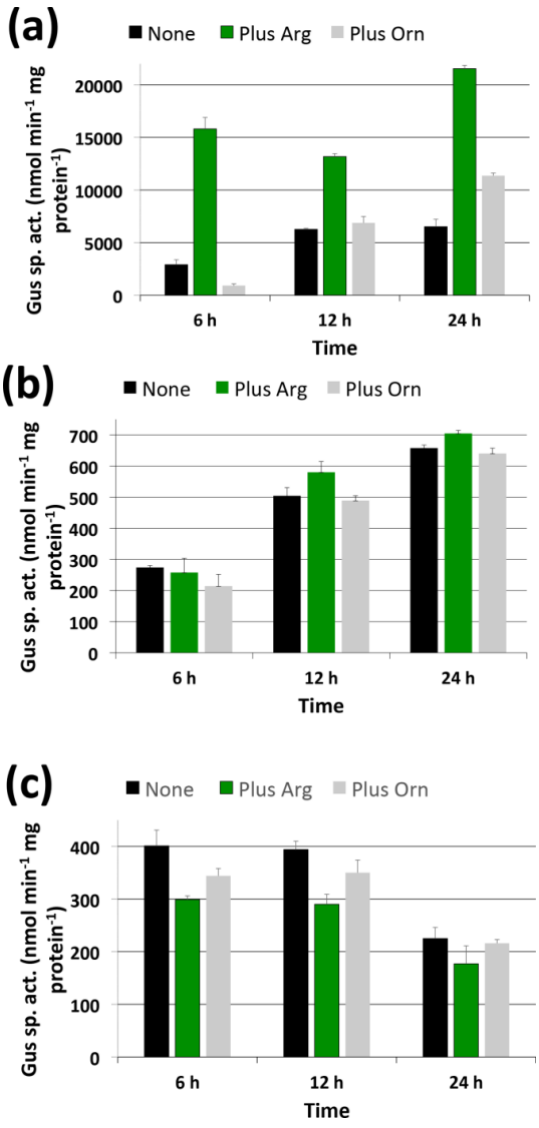


**Fig. 5.** The effect of exogenous arginine and ornithine on the transcriptional expression of the *argI1* (a), *argI2* (b) and *argIR* (c) genes fused to *gusA* and expressed in *S. meliloti* 1021. The strains were grown in MMS-$NH_4$ without an exogenous amino acid (None, black bars), MMS-$NH_4$ containing 1 mM arginine (Plus Arg, green bars) or MMS-$NH_4$ with 1 mM ornithine (Plus Orn, grey bars). Gus sp. acts. (nmol $min^{-1}$ mg $protein^{-1}$) were determined in cells from 6, 12 and 24 h cultures. Values are the mean±SD for three independent experiments, each with two technical replicates of two biological replicates.

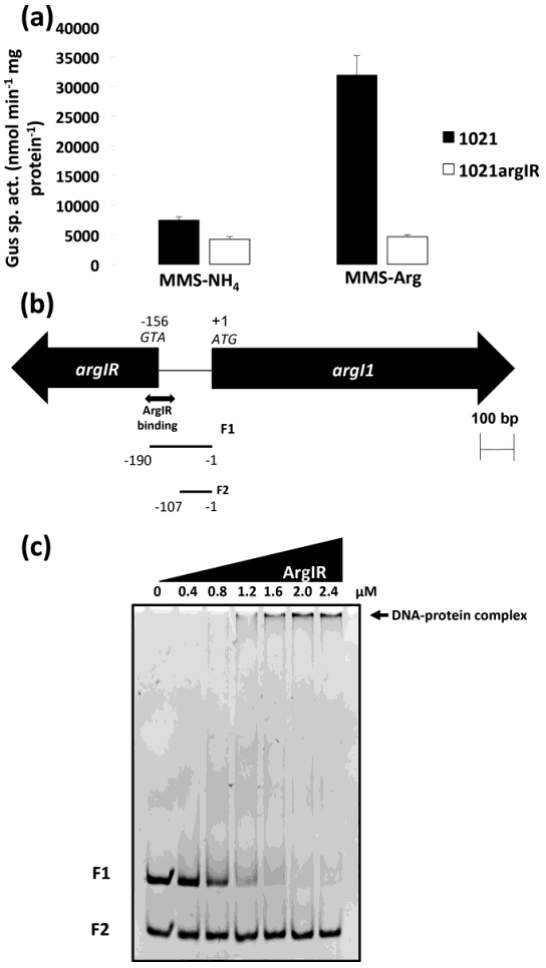


**Fig. 6.** ArgIR is involved in the positive regulation of *argI1* in *S. meliloti* 1021. (a) *β*-glucuronidase (Gus)-specific activities (nmol $min^{-1}$ mg $protein^{-1}$) in *S. meliloti* 1021 wild-type and 1021argIR containing the *argI1:: gusA* transcriptional fusion plasmid. Cells were grown for 16 h in MMS-$NH_4$ or MMS-Arg. (b) Genomic arrangement of *argI1–argIR*. The divergently transcribed *argI1* (924 bp) and *argIR* (435 bp) are separated by a 155 nt intergenic region (thin line). The letters in italics are the *argI1* and *argIR* translational start codons. The black double-headed arrow is the ArgIR binding site determined by EMSA (see below), located between nucleotides −108 to −190 relative to the *argI1* ATG codon. DNA fragments F1 and F2 used for the EMSA are indicated. (c) EMSA performed with increasing concentrations of purified ArgIR protein and the PCR-generated fragments F1 (nt −1 to −190 from the *argI1* translation start codon) and F2 (nt −1 to −107 relative to the *argI1* translation start codon). The gel mobility shifts demonstrate that ArgIR interacts with the region encompassing −108 to −190 nt upstream of the *argI1* regulatory region.

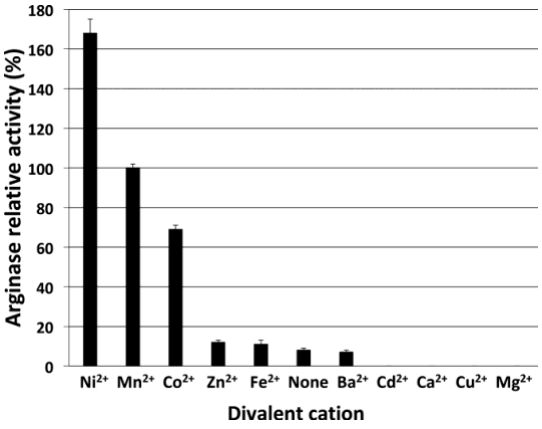


**Fig. 7.** Arginase relative activity of the purified 6His-Sumo-ArgI1 measured with different metal cofactors or without metal (None) at pH 8. The activity of the reaction with $Mn^{2+}$ was set at 100%. Values are the mean±SD for at least three independent experiments.

were performed on cells from early- (6 h), mid- (12 h) and late-exponential (24 h) growth phases. *argI1* expression increased with culture age in the unsupplemented and ornithine-containing cultures, while with exogenous arginine *argI1* expression was lower at 12 h than at 6 or 24 h (Fig. 5a). Arginine supplementation of the medium increased *argI1* expression by 5.4-, 2.1- and 3.3-fold relative to the control at 6, 12 and 24 h, respectively (Fig. 5a). These arginine-induced increases in *argI1* gene expression are fairly similar to the 4.5-fold increase in arginase specific activity for strain 1021 grown with arginine (Fig. 3). The increase in *argI1* gene expression in the ornithine-supplemented cultures versus the control was 0.3, 1.1 and 1.7 at 6, 12 and 24 h, respectively (Fig. 5a). The 12 and 24 h increases in *argI1* expression in the ornithine-supplemented cultures were similar to the 1.4-fold increase in arginase specific activity seen in the wild-type grown with exogenous ornithine for 18 h (results not shown).

In contrast to the increased expression of *argI1* in response to exogenous arginine or ornithine, *argI2* expression was not significantly affected when the fusion strain was grown in the presence of either of these amino acids (Fig. 5b). *argI2* expression approximately doubled between 6 and 12 h, and showed a slight further increase at 24 h. The overall *argI2::gusA* expression values were generally one-tenth or less of those for the *argI1::gusA* fusion (Fig. 5a).

### ArgIR (SMc03092) positively regulates *argI1* expression

The gene *smc03092* is divergently transcribed from *argI1* and is annotated as a transcriptional regulator in the National Center for Biotechnology Information NCBI Gene database. The 144 amino acid deduced sequence of this putative regulator has similarities to members of the Lrp (leucine-responsive protein) superfamily. There are several documented cases where rhizobial Lrp-like regulators are divergently transcribed from their regulatory targets [10].

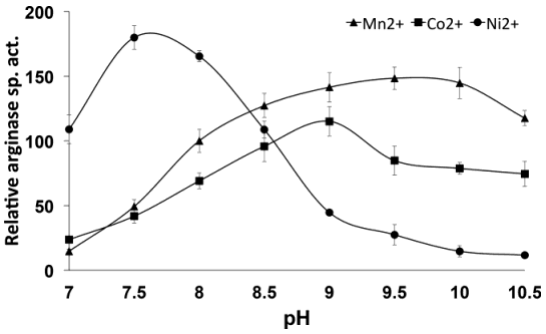


**Fig. 8.** Arginase relative activity of the purified 6His-Sumo-ArgI1 at different pHs with $Mn^{2+}$, $Co^{2+}$ or $Ni^{2+}$ as metal cofactor. The activity with $Mn^{2+}$ obtained at pH 8 was set to 100%. Values are the mean±SD for two independent experiments.

This led us to hypothesize that SMc03092 might regulate *argI1* transcription. We thus inactivated *smc03092* in strain 1021 and characterized *argI1* transcription in the resulting mutant. Measurements of *argI1::gusA* transcriptional activities in the 1021 wild-type and 1021 *smc03092* mutant were taken for cells grown in MMS-$NH_4$ with and without 1 mM exogenous arginine (Fig. 5a). In the wild-type, *argI1::gusA* expression was 4.3-fold higher when cells were grown in the presence of arginine. In contrast, no induction of *argI1::gusA* expression occurred in the *smc03092* mutant grown with arginine, which maintained a basal level of *argI1* expression. This indicates that SMc03092 positively regulates *argI1* expression in response to arginine. SMc03092 and its encoding gene are hereafter referred to as ArgIR (ArgI Regulator) and *argIR*, respectively. Analysis of a *argIR::gusA* transcriptional fusion expressed in strain 1021 showed that exogenous arginine or ornithine did not increase expression of the regulator, but instead slightly lowered its expression or caused no change (Fig. 5c). The expression of the *argIR::gusA* fusion in the 1021 *argIR* null mutant grown in MMS-NH4 and MMS-Arg increased 1.6- and 1.4-fold versus its expression in the wild-type background, indicating a degree of autorepression (results not shown). The expression levels of the *argIR::gusA* fusion were generally 10- to 100-fold lower than those of the *argI1::gusA* fusion (Fig. 5a).

To determine if the ArgIR protein bound to the *argI1* promoter region, we performed EMSAs with the purified 6His-SumoArgIR protein and the entire (nt −1 to −190) or partial (−1 to −107) *argI1* promoter region (nt numbering with respect to the *argI1* translational start site) (Fig. 6b and S1). A mobility shift of DNA–protein complex occurred starting at 1.2 µM 6His-Sumo-ArgIR when the entire promoter region was assayed, while no mobility shift occurred with the truncated promoter region even with 2.4 µM 6His-Sumo-ArgIR (Fig. 6c). These results indicate that ArgIR directly activates *argI1* expression and that the binding of ArgIR to the promoter occurred within the nt −190 to −108 region (Fig. 5b and c). To establish if arginine or ornithine works as a co-activator with ArgIR, we performed EMSAs individually in the presence or absence of varied concentrations of these amino acids. No differences in the binding affinity of ArgIR for the intergenic region were observed (data not shown).

The requirement for ArgIR in *argI1* induction was confirmed by performing arginase activity assays on the 1021 wild-type, the 1021argI1 and 1021argIR null mutants, and their genetically complemented derivatives (Fig. 3). The induction of arginase activity by exogenous arginine was completely dependent on the presence of a functional *argIR* gene. The 1021argIR mutant complemented with the *argIR* gene regained arginase inducibility to a degree similar to that of the wild-type. The 1021argI1(argI1)-complemented strain had 1.4-fold higher arginase activity when grown with arginine supplementation compared to the activity in the wild-type grown under the same conditions, while the uninduced arginase activity in both strains was similar.

### *argIR* is not required for wild-type growth with arginine as nitrogen source

Growth kinetics and specific growth rates were determined for the *argIR* and *argIR*(*argIR*) strains grown in MMS-$NH_4$, MMS-Arg or MMS-Orn (Fig. 4 and Table 2). In MMS-$NH_4$, both strains had similar growth kinetics (Fig. 4a) and their specific growth rates were about 1.1-fold higher than wild-type (Table 2). In MMS-Arg and to a lesser degree in MMS-Orn, 1021argIR had slower growth kinetics than the wild-type, with 13 and 8% reductions in specific growth rate, respectively (Table 2). In comparison to the wild-type, the 1021argIR(argIR)-complemented mutant grew similarly to wild-type, and had about 1.1-fold higher specific growth rates in both media (Fig. 4 and Table 2).

### ArgI1 activity *in vitro* is highly dependent on the metal cofactor and pH

The purified 6His-Sumo-ArgI1 rapidly lost enzymatic activity (results not shown), a characteristic also noted for the 6His-tagged arginase purified from *Helicobacter pylori* [32, 33]. Due to its temporal lability, we characterized the ArgI1 protein immediately after purification, without removing the 6His-Sumo tag. The effect of 10 different metal ions on the activity of the purified 6His-Sumo-ArgI1 was determined and the results normalized to its activity in the presence of $MnCl_2$ (Fig. 7). Reactions containing $NiCl_2$ had the highest activity, which was 1.6-fold greater than that of the reaction containing $MnCl_2$. Activity with $CoCl_2$ was 69% that of reactions with $MnCl_2$. Reactions with $ZnCl_2$, $FeCl_2$ and $BaCl_2$ had very low activities similar to those of reactions without a metal cofactor, while addition of the chloride salts of $Cd^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Cu^{2+}$ or $Mg^{2+}$ resulted in no detectable arginase activity.

The activity of the 6His-Sumo-ArgI1 as a function of pH in the range of 7 to 10.5 was determined in reactions containing $Ni^{2+}$, $Mn^{2+}$ or $Co^{2+}$. The results were expressed as a percentage of activity with respect to that obtained in the standard reaction with $Mn^{2+}$ as cofactor at pH 8.0 (Fig. 8). With $Mn^{2+}$,

**Table 3.** Kinetic parameters of purified 6His-Sumo-ArgI1 determined at pH 8.0 with 0.2 mM of the indicated metal cofactor. Values are the mean±SD for two independent experiments

| Cation | $K_m$ (mM) | $V_{max}$ (μM min$^{-1}$) | $k_{cat}$ (s$^{-1}$) | $k_{cat}/K_m$ (s$^{-1}$ mM$^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|
| $Ni^{2+}$ | 3.42±0.35 | 3452±125 | 26.24±0.97 | 7.83±0.010 |
| $Mn^{2+}$ | 5.51±1.37 | 1228±119 | 9.48±0.92 | 1.77±0.004 |
| $Co^{2+}$ | 4.90±0.63 | 1142±64 | 8.82±0.49 | 1.81±0.002 |

higher than standard reaction activities were obtained at the more alkaline pHs, while at pH 7.5 and 7.0 the activities were only 49 to 15%, respectively, of those obtained at pH 8. Maximal activity with $Mn^{2+}$ occurred at pH 9.5 (148% of the activity obtained in the pH 8 standard reaction). With $Ni^{2+}$, the highest activity was at pH 7.5 (180% of standard reaction activity) but was less than 50% of the standard reaction activity at pH 9 or higher. With $Co^{2+}$, activity increased almost linearly from pH 7 (24% of standard reaction activity) to peak at pH 9 (115% of the standard reaction), and then declined to about 85% of standard reaction activity at pH 9.5, 10 and 10.5.

### Kinetic parameters and subunit composition of the 6His-Sumo-ArgI1

The kinetic characteristics of the purified 6His-Sumo-ArgI1 were determined at pH 8.0 in the presence of $Ni^{2+}$, $Mn^{2+}$ or $Co^{2+}$ (Table 3). With these cofactors, its affinity ($K_m$) for arginine ranged from 3.42 to 5.51 mM, the low and high extremes being obtained with $Ni^{2+}$ and $Mn^{2+}$, respectively. The $V_{max}$ and $k_{cat}$ values obtained with $Ni^{2+}$ as a cofactor were more than twice those obtained with $Mn^{2+}$ or $Co^{2+}$ (Table 3), consistent with the higher activity of 6His-Sumo-ArgI1 with $Ni^{2+}$ in comparison to $Mn^{2+}$ or $Co^{2+}$ (Fig. 8). The superiority of $Ni^{2+}$ in promoting arginine hydrolysis by the enzyme is also reflected in the much higher catalytic efficiency ($k_{cat}/K_m$) obtained with this cofactor (Table 3).

The purified 6His-Sumo-ArgI1 migrated as a single band with an apparent MW of 47 kDa on an SDS-PAGE gel (Fig. S2). Subtracting the approximately 13 kDa contributed by the 6His-Sumo tag, the MW of the native subunit would be 34 kDa, close to the 32.87 kDa calculated from the ArgI1 deduced amino acid sequence. Native polyacrylamine gel electrophoresis of the 6His-Sumo-ArgI1 subjected to progressive denaturation with increasing concentrations of urea indicated a trimeric structure for the enzyme (Fig. S2).

## DISCUSSION

Studies of bacterial arginases have mostly focused on the enzymes produced by relatively few taxons, including *H. pylori* and several species of *Bacillus*. Arginase has not been characterized in nitrogen-fixing members of the *Rhizobiaceae*. The present work provides an initial physiological, biochemical and genetic characterization of the arginase ArgI1 in *S. meliloti*, which our results show is a major enzyme for the aerobic catabolism of arginine.

The role of ArgI1 as the sole functional arginase is supported by the findings that (i) purified 6His-Sumo-ArgI1, but not 6His-Sumo-ArgI2, is enzymatically active; (ii) the ArgI2 deduced amino acid sequence lacks the key His residues involved in the coordination of the metal cofactor; and (iii) arginase activity is undetectable in a 1021 *argI1* null mutant. In minimal medium containing arginine as a sole nitrogen source, the *argI1* mutant grows significantly more slowly and reaches a lower cell density than the wild-type. We have proposed that the products of arginase activity in *S. meliloti*, ornithine and urea, serve as nitrogen sources when acted upon by ornithine cyclodeaminase (Ocd) and urease, respectively [10]. The 1021argI1 mutant grew similarly to the wild-type with ornithine as nitrogen source because this substrate is catabolized to proline and $NH_3$ by Ocd [10]. This phenotype is in contrast to the complete inability of an *A. tumefaciens* arginase mutant to grow with arginine or ornithine as a nitrogen source, a defect that in fact stems from the transposon insertion in the arginase gene having a polar effect on the downstream *ocd* gene [34]. Our assays for enzymes that might explain the residual growth of the 1021argI1 mutant with arginine as nitrogen source showed that arginine decarboxylase was detectable and could, along with agmatinase, produce putrescine, which could be degraded to ultimately produce ammonium and glutamate [35]. That the assays for arginine deiminase only revealed trace levels of citrulline production is consistent with the arginine deiminase pathway only operating under microaerobic conditions [35]. The growth of *S. meliloti* in MMS-Arg inhibits the reaction catalyzed by ArgB [13], making it unlikely that biosynthetically derived ornithine could serve as a nitrogen source in the 1021argI1mutant [10].

Bacterial arginase activity is increased markedly when cells are grown in the presence of exogenous arginine, ornithine and sometimes proline [36–38]. Arginase activity in *A. tumefaciens* grown with exogenous arginine or ornithine was increased by orders of magnitude [38]. Similarly, in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*, arginase activity increased 40- and 144-fold in arginine-supplemented minimal medium. Arginase-specific activity in *S. meliloti* grown in minimal medium without added arginine (Fig. 3) was similar to that reported for *A. tumefaciens* and *Bacillus* spp. [36–38], while its specific activity in medium with exogenous arginine ranged from 3 to 19% of that reported in those species grown with arginine supplementation. Thus, arginase-specific activity in *S. meliloti* increased by a modest 4.5- and 1.4-fold in arginine- and ornithine-supplemented medias, respectively (Fig. 3 and results not shown). As in *A. tumefaciens* [38], exogenous proline did not induce the *S. meliloti* arginase activity (results not shown).

Many arginases have their highest catalytic activity with $Mn^{2+}$ as a metal cofactor, but also have some activity with other divalent transition metals [39, 40]. The *S. meliloti* 6His-Sumo-ArgI1 assayed at pH 8 has significant activity with three different transition metal cofactors, in the order $Ni^{2+}$> $Mn^{2+}$> $Co^{2+}$. Bacterial arginases have different degrees of activity with these transition metals. For example, arginase from *Bacillus*

*anthracis* strain 77026 (characterized as a 6His protein) had maximal activity with $Ni^{2+}$, while $Co^{2+}$ and $Mn^{2+}$ permitted only a small fraction of the activity obtained with $Ni^{2+}$ [41]. The *H. pylori* purified 6His-arginase had its highest activity with $Co^{2+}$, while in comparison $Mn^{2+}$ and $Ni^{2+}$ allowed only low activity [32, 33]. The *Bacillus thuringiensis* arginase had high activity with either $Mn^{2+}$ or $Ni^{2+}$ and much lower activity with $Co^{2+}$, while no significant activity was obtained with $Cu^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Fe^{2+}$, $Mg^{2+}$ or $Zn^{2+}$ [42]. Arginase from *Bacillus brevis* had a divalent ion preference of $Mn^{2+}$ >> $Ni^{2+}$≈ $Co^{2+}$ [43]. The *A. tumefaciens* C58 arginase in dialyzed crude extracts was active with $Mn^{2+}$, but not $Fe^{2+}$, $Co^{2+}$ or $Ni^{2+}$ [44].

Arginase metal cofactor preferences in different bacteria could reflect an evolutionary selection for cofactors that confer 'sufficient' versus 'optimal' catalytic activity on the enzyme, as required for its biological function [45]. Different cofactor preferences for arginases could also be determined by the environmental availability of specific transition metals during their evolution [46, 47]. Two reasons for the abilities of different metal cofactors to affect arginase catalytic activity are their impact on enzyme stability [48] and their contrasting abilities to confer high reactivity to the catalytic nucleophilic metal-bound hydroxide and maintain it in the correct location within the active site [49]. The use of $Ni^{2+}$ and $Co^{2+}$as a metal cofactor by enzymes only occurs in about 2 and 4% of metalloenzymes, respectively, while $Mn^{2+}$ functions in about 10% of them [50].

With the exception of the *H. pylori* arginase that functions best at pH 6.1 [32], most arginases have their highest activity in the basic pH range (pH 8.5–11.0). 6His-Sumo-ArgI1 had its highest activity with $Ni^{2+}$ at pH 7.5. With $Mn^2$ it was most active over a broad pH range of 8.5–10.5 and with $Co^{2+}$ its highest activity centered at pH 9.0. pH-dependent changes in catalytic activity with different cofactors have been reported in other arginases. The arginase from *Rummeliibacillus pycnus*, for example, has its highest activity at pH 6.5 in the presence of $Ni^{2+}$ and at pH 9.5 in the presence of $Mn^{2+}$ [51]. The pH–activity profiles of the *H. pylori* arginase differed markedly with $Co^{2+}$ and $Mn^{2+}$, possibly due to the effect of their different acid equilibrium constants on active site tertiary structure [52]. Purified (His-tagged) *Bacillus pycnus* arginase at pH 6.5 had its highest activity with $Ni^{2+}$, while $Mn^{+2}$ permitted less than half the activity obtained with $Ni^{2+}$. At pH 9.5, however, the enzyme had maximal activity with $Mn^{2+}$ and only a small fraction of this activity with $Ni^{2+}$ [53].

6His-Sumo-ArgI1 had a moderately higher apparent affinity for arginine ($K_m$ 3.4 mM) with $Ni^{2+}$ as compared to $Mn^{2+}$ or $Co^{2+}$ ($K_m$s of 5.5 and 4.9 mM, respectively). Similarly, arginase from *H. pylori* had a lower $K_m$ for arginine (6.7 mM) when assayed with its preferred divalent cation ($Co^{2+}$) as compared to $Mn^{2+}$ ($K_m$ 8.4 mM) [52]. The 6His-Sumo-ArgI1 range of $K_m$ values obtained with the three metal cofactors were similar to those of arginases (assayed under a single reaction condition) from *Bacillus caldovelox* (3.5 mM) [54] and *Bacillus licheniformis* (2.2 mM) [55], but lower than those from *Geobacillus thermodenitrificans* (172 mM) [56], and *B. thuringeiensis* (15.5 mM) [42]. 6His-Sumo-ArgI1 had more than 1.5-fold greater specific activity when assayed at pH 8 with $Ni^{2+}$ as opposed to $Mn^{2+}$ or $Co^{2+}$, consistent with the its greater turnover number ($k_{cat}$) and catalytic efficiency ($k_{cat}/K_m$) with $Ni^{2+}$ (Table 3).

We determined that 6His-Sumo-ArgI1 was a trimeric protein (Fig. S2). A variety of oligomeric states have been reported for bacterial arginases. Structural studies of the arginase from *Zymomonas mobilis* ZM4 revealed a dimeric protein [57], while that from *Rhodobacter capsulatus* was a tetramer based on chromatographic and sedimentation analysis [58]. The *H. pylori* arginase occurs as a combination of monomers and dimers [52] and the arginases of two different species of *B. brevis* were reported to be tetramers and hexamers, respectively [43, 59]. The arginases from *B. thuringiensis* and *B. caldovelox* are hexameric [42, 54].

*B. subtilis* provides the best studied example of the genetic regulation of bacterial arginase gene expression. In this organism, the positive regulators RocR and AhrC (ArgR) appear to interact to bring about the sigma factor L-dependent transcriptional induction of the arginase gene by ornithine and arginine [60, 61]. Comparative genome analysis indicates that *S. meliloti* lacks orthologues of RocR and AhrC (ArgR) ([10] and unpublished results). The *argI1* gene is divergently transcribed from a gene, now designated *argIR*, whose product has sequence motifs indicative of a leucine-responsive protein (Lrp) family regulator. The *S. meliloti* gene encoding 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HpdA) is transcriptionally regulated by the Lrp-like product of the divergently transcribed *hpdR* [62]. To determine the function of ArgIR, we mutated the encoding gene and found that it was required for *argI1* induction by arginine or ornithine (Fig. 6a). The *E. coli* Lrp is a global regulator that controls a very large number of genes. In contrast, many other bacteria contain multiple Lrp-like proteins that have much narrower functions in gene regulation [63, 64]. Our data indicate that ArgIR is an example of this class of Lrp-like proteins, with at least 15 of these being encoded in the *S. meliloti* genome. Our analysis showed that ArgIR bound to the *argI1* promoter in a region preceding the predicted *argI1* transcriptional start.

In summary, ArgI1 appears to be the sole functional arginase in *S. meliloti* and is important in the utilization of arginine as a sole nitrogen source under aerobic conditions. *argI1* gene induction by arginine or ornithine is dependent on the Lrp-like regulator ArgIR. We are currently examining the importance of ArgI1 in the production of polyamines and in *S. meliloti*–alfalfa interaction.

Funding information
A. A. I. is a doctoral student in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 290118 from CONACyT. Work was supported by DGAPA-PAPIIT grants IN208811, IN210114 and IN206317 to M. F. D.

Acknowledgements
We thank Victor Becerra-Rivera for help in Southern hybridization experiments and Mariana Hernández Flores for excellent technical assistance.

Author contributions
A. A. I. formulated research goals and methodology, performed most experiments, analysed data and wrote the draft manuscript. V. M. H. performed most of the enzyme kinetics experiments. L. M. A. and I. H.-L. participated in the EMSA assays and E. C.-N. purified and determined the subunit composition of ArgI1. L. G. provided resources, supervised the mutant complementation and gene expression experiments and performed Southern hybridizations. M. F. D. conceived, administered and supervised the project, secured funding, analysed data, performed some experiments and wrote the final draft. All authors approved the final draft.

Conflicts of interest
The authors declare that there are no conflicts of interest.

References
1. Borders CL, Broadwater JA, Bekeny PA, Salmon JE, Lee AS *et al*. A structural role for arginine in proteins: multiple hydrogen bonds to backbone carbonyl oxygens. *Protein Sci* 1994;3:541–548.
2. Lappi AK, Lensink MF, Alanen HI, Salo KEH, Lobell M *et al*. A conserved arginine plays a role in the catalytic cycle of the protein disulphide isomerases. *J Mol Biol* 2004;335:283–295.
3. Llácer JL, Fita I, Rubio V. Arginine and nitrogen storage. *Curr Opin Struct Biol* 2008;18:673–681.
4. Lu C-D. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;70:261–272.
5. Xu Y, Labedan B, Glansdorff N. Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71:36–47.
6. Gao J-L, Weissenmayer B, Taylor AM, Thomas-Oates J, López-Lara IM *et al*. Identification of a gene required for the formation of lyso-ornithine lipid, an intermediate in the biosynthesis of ornithine-containing lipids. *Mol Microbiol* 2004;53:1757–1770.
7. Vollmer W. Bacterial outer membrane evolution via sporulation? *Nat Chem Biol* 2012;8:14–18.
8. Haas H, Eisendle M, Turgeon BG. Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* 2008;46:149–187.
9. Michael AJ. Polyamine function in archaea and bacteria. *J Biol Chem* 2018;293:18693–18701.
10. Dunn MF. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Crit Rev Microbiol* 2015;41:411–451.
11. Kerppola TK, Kahn ML. Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. *J Gen Microbiol* 1988;134:913–919.
12. Kumar A, Vij N, Randhawa GS. Isolation and symbiotic characterization of transposon Tn5-induced arginine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. *Indian J Exp Biol* 2003;41:1198–1204.
13. Hernández VM, Girard L, Hernández-Lucas I, Vázquez A, Ortíz-Ortíz C *et al*. Genetic and biochemical characterization of arginine biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Microbiology* 2015;161:1671–1682.
14. Becker A, Bergès H, Krol E, Bruand C, Rüberg S *et al*. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 2004;17:292–303.
15. Puskás LG, Nagy ZB, Kelemen JZ, Rüberg S, Bodogai M *et al*. Wide-range transcriptional modulating effect of ntrR under microaerobiosis in Sinorhizobium meliloti. *Mol Genet Genomics* 2004;272:275–289.
16. Bobik C, Meilhoc E, Batut J. FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 2006;188:4890–4902.
17. Becerra-Rivera VA, Bergström E, Thomas-Oates J, Dunn MF. Polyamines are required for normal growth in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology* 2018;164:600–613.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.
19. Reese MG. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput Chem* 2001;26:51–56.
20. Solovyev V, Salamov A. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In: Li RW (editor). *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*. New York, USA: Nova Science Publishers; 2011. pp. 61–78.
21. Martínez-Salazar JM, Romero D. Role of the *ruvB* gene in homologous and homeologous recombination in *Rhizobium etli*. *Gene* 2000;243:125–131.
22. Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G *et al*. 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* 1994;145:69–73.
23. Choi K-H, Schweizer HP. mini-Tn7 insertion in bacteria with single *att*Tn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* 2006;1:153–161.
24. Girard L, Brom S, Dávalos A, López O, Soberón M *et al*. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL-fixK* cascade. *Mol Plant Microbe Interact* 2000;13:1283–1292.
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–254.
26. Vogel HJ, Bonner DM. Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J Biol Chem* 1956;218:97–106.
27. Lindqvist A. Characterization of arginine deiminase (ADI) and adenosine deaminase (ADA) for the biocatalytic buffer system. MS thesis, Uppsala University School of Engineering, Sweden; 2005.
28. Bisswanger H. Enzyme kinetics. *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002. pp. 51–160.
29. Garfin DE. One-Dimensional gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1990;182:425–441.
30. Medina-Aparicio L, Rebollar-Flores JE, Gallego-Hernández AL, Vázquez A, Olvera L *et al*. The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *J Bacteriol* 2011;193:2396–2407.
31. Bewley MC, Jeffrey PD, Patchett ML, Kanyo ZF, Baker EN. Crystal structures of *Bacillus caldovelox* arginase in complex with substrate and inhibitors reveal new insights into activation, inhibition and catalysis in the arginase superfamily. *Structure* 1999;7:435–448.
32. McGee DJ, Zabaleta J, Viator RJ, Testerman TL, Ochoa AC *et al*. Purification and characterization of *Helicobacter pylori* arginase, RocF: unique features among the arginase superfamily. *Eur J Biochem* 2004;271:1952–1962.
33. Zhang J, Zhang X, Wu C, Lu D, Guo G *et al*. Expression, purification and characterization of arginase from *Helicobacter pylori* in its apo form. *PLoS One* 2011;6:e26205.
34. Cho K, Fuqua C, Martin BS, Winans SC. Identification of *Agrobacterium tumefaciens* genes that direct the complete catabolism of octopine. *J Bacteriol* 1996;178:1872–1880.
35. Dunn MF. Rhizobial amino acid metabolism: polyamine biosynthesis and functions. In: D'Mello FJ (editor). *Handbook of Microbial Metabolism of Amino Acids*. Wallingford, Oxfordshire, UK: CAB International; 2017. pp. 352–370.
36. Laishley EJ, Bernlohr RW. Regulation of arginine and proline catabolism in *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol* 1968;96:322–329.

37. Baumberg S, Harwood CR. Carbon and nitrogen repression of arginine catabolic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1979;137:189–196.
38. Dessaux Y, Petit A, Tempé J, Demarez M, Legrain C *et al*. Arginine catabolism in *Agrobacterium* strains: role of the Ti plasmid. *J Bacteriol* 1986;166:44–50.
39. Malik A, Singh H, Pareek A, Tomar S. Biochemical and biophysical insights into the metal binding spectrum and bioactivity of arginase of *Entamoeba histolytica*. *Metallomics* 2018;10:623–638.
40. Uribe E, Reyes M-B, Martínez I, Mella K, Salas M *et al*. Functional analysis of the $Mn^{2+}$ requirement in the catalysis of ureohydrolases arginase and agmatinase - a historical perspective. *J Inorg Biochem* 2020;202:110812.
41. Viator RJ, Rest RF, Hildebrandt E, McGee DJ. Characterization of *Bacillus anthracis* arginase: effects of pH, temperature, and cell viability on metal preference. *BMC Biochem* 2008;9:15–14.
42. Zhang T, Guo Y, Zhang H, Mu W, Miao M *et al*. Arginase from *Bacillus thuringiensis* SK 20.001: purification, characteristics, and implications for L-ornithine biosynthesis. *Process Biochem* 2013;48:663–668.
43. Shimotohno KW, Iida J, Takizawa N, Endo T. Purification and characterization of arginine amidinohydrolase from *Bacillus brevis* TT02-8. *Biosci Biotechnol Biochem* 1994;58:1045–1049.
44. Schrell A, Alt-Moerbe J, Lanz T, Schroeder J. Arginase of *Agrobacterium* Ti plasmid C58. DNA sequence, properties, and comparison with eucaryotic enzymes. *Eur J Biochem* 1989;184:635–641.
45. Valdez CE, Alexandrova AN. Why urease is a di-nickel enzyme whereas the CcrA $\beta$-lactamase is a di-zinc enzyme. *J Phys Chem B* 2012;116:10649–10656.
46. Mus F, Colman DR, Peters JW, Boyd ES. Geobiological feedbacks, oxygen, and the evolution of nitrogenase. *Free Radic Biol Med* 2019;140:250–259.
47. Valdez CE, Smith QA, Nechay MR, Alexandrova AN. Mysteries of metals in metalloenzymes. *Acc Chem Res* 2014;47:3110–3117.
48. Sadarangani V, Rahman S, Sau AK, Kumar Sau A. Metal ions-induced stability and function of bimetallic human arginase-I, a therapeutically important enzyme. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom* 2018;1866:1153–1164.
49. Scolnick LR, Kanyo ZF, Cavalli RC, Ash DE, Christianson DW. Altering the binuclear manganese cluster of arginase diminishes thermostability and catalytic function. *Biochemistry* 1997;36:10558–10565.
50. Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *J Biol Inorg Chem* 2008;13:1205–1218.
51. Huang K, Zhang T, Jiang B, Mu W, Miao M. Characterization of a thermostable arginase from *Rummeliibacillus pycnus* SK31.001. *J Mol Catal B Enzym* 2016;133:S68–S75.
52. Srivastava A, Sau AK. Biochemical studies on *Helicobacter pylori* arginase: insight into the difference in activity compared to other arginases. *IUBMB Life* 2010;62:906–915.
53. Haung K, Zhang T, Jiang B, Mu W, Miao M. A coupled system involving arginase and urease for L-ornithine production. *J Mol Catal B-Enzym* 2017;133:5303–5310.
54. García D, Uribe E, Salgado M, Martínez MP, Carvajal N. Mutageni and kinetic support for an allosteric site in arginase from th extreme thermophile *Bacillus caldovelox*, which allows activatio by arginine. *Biochimie* 2015;108:8–12.
55. Ramaley RF, Bernlohr RW. Postlogarithmic phase metabolism c sporulating microorganisms. II. The occurrence and partial purifi cation of an arginase. *J Biol Chem* 1966;241:620–623.
56. Huang K, Mu W, Zhang T, Jiang B, Miao M. Cloning, expression, an characterization of a thermostable L-arginase from *Geobacillu thermodenitrificans* NG80-2 for L-ornithine production. *Biotechnc Appl Biochem* 2016;63:391–397.
57. Hwangbo S-A, Kim J-W, Jung S-J, Jin KS, Lee J-O *et al*. Characteri zation of a dimeric arginase from *Zymomonas mobilis* ZM4. *Fror Microbiol* 2019;10:2755.
58. Moreno-Vivián C, Soler G, Castillo F. Arginine catabolism in th phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. Purificatio and properties of arginase. *Eur J Biochem* 1992;204:531–537.
59. Kanda M, Ohgishi K, Hanawa T, Saito Y. Arginase of *Bacillus brevi* Nagano: purification, properties, and implication in gramicidin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 1997;344:37–42.
60. Gardan R, Rapoport G, Débarbouillé M. Role of the transcriptiona activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillu subtilis*. *Mol Microbiol* 1997;24:825–837.
61. Peng Q, Wang G, Liu G, Zhang J, Song F. Identification of metabc lism pathways directly regulated by sigma(54) factor in *Bacillu thuringiensis*. *Front Microbiol* 2015;6:407.
62. Loprasert S, Whangsuk W, Dubbs JM, Sallabhan R, Somsongkul *et al*. HpdR is a transcriptional activator of *Sinorhizobium melilo hpdA*, which encodes a herbicide-targeted 4-hydroxyphenylpyruvat dioxygenase. *J Bacteriol* 2007;189:3660–3664.
63. Brinkman AB, Ettema TJG, de Vos WM, van der Oost J. The LR family of transcriptional regulators. *Mol Microbiol* 2003;48:287–29
64. Cho B-K, Federowicz S, Park Y-S, Zengler K, Palsson Bernhar Ø. Deciphering the transcriptional regulatory logic of amino aci metabolism. *Nat Chem Biol* 2012;8:65–71.
65. Schweizer HP. A method for construction of bacterial hosts fc *lac*-based cloning and expression vectors: alpha-complementatio and regulated expression. *Biotechniques* 1994;17:452–456.
66. Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM. Physica and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutant of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *Bacteriol* 1982;149:114–122.
67. Figurski DH, Helinski DR. Replication of an origin-containing deriv ative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided *i trans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76:1648–1652.
68. Kessler B, de Lorenzo V, Timmis KN. A general system to inte grate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram-negativ eubacteria: regulation of the Pm promoter of the TOL plasmi studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Gene* 1992;233:293–301.
69. Bao Y, Lies DP, Fu H, Roberts GP. An improved Tn7-based syster for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes c gram-negative bacteria. *Gene* 1991;109:167–168.


Edited by: J. Cavet and C. Bruand

## 11. LITERATURA CITADA


Abraham T, Prenner EJ, Lewis RN, et al. 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. 2014;1838(5):1420-1429.

Ash DE. Structure and function of arginases. J Nutr. 2004;134:2760S–4S.

Barnett MJ, Fisher RF, Jones T, et al. Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(17):9883-9888.

Becerra-Rivera VA, Bergström E, Thomas-Oates J et al. Polyamines are required for normal growth in *Sinorhizobium meliloti*. Microbiology (Reading). 2018;164(4):600-613.

Becerra-Rivera VA, Dunn MF. Polyamine biosynthesis and biological roles in rhizobia. FEMS Microbiol Lett. 2019;366:fnz084.

Belitsky BR, Sonenshein Al. An enhancer element located downstream of the major glutamate dehydrogenase gene of *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci USA. 1999, 96 (18) 10290-10295.

Bewley MC, Jeffrey PD, Patchett ML et al. Crystal structures of *Bacillus caldovelox* arginase in complex with substrate and inhibitors reveal new insights into activation, inhibition and catalysis in the arginase superfamily. Structure. 1999;7:435–48.

Bobik C, Meilhoc E, Batut J. FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol. 2006;188:4890–902.

Bosello M, Robbel L, Linne U, et al. Biosynthesis of the siderophore rhodochelin requires the coordinated expression of three independent gene clusters in *Rhodococcus jostii* RHA1. J Am Chem Soc. 2011;133(12):4587-4595.

Brewin NJ. 2004. Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis, Critical Reviews in Plant Sciences, 23:4, 293-316.

Brinkman AB, Ettema TJ, de Vos WM, et al. The Lrp family of transcriptional regulators. Mol Microbiol. 2003;48(2):287-294.

Broughton WJ, Jabbouri S, Perret X. Keys to symbiotic harmony. J Bacteriol. 2000;182(20):5641-5652.

Buck M, Gallegos MT, Studholme DJ, et al. The bacterial enhancer-dependent sigma(54) (sigma(N)) transcription factor. J Bacteriol. 2000;182:4129–4136.

Burén S, Rubio LM. State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. FEMS Microbiol Lett. 2018;365(2):fnx274.

Bush M, Dixon R. The role of bacterial enhancer binding proteins as specialized activators of σ54-dependent transcription. Microbiol Mol Biol Rev. 2012;76:497–529.

Caldwell RW, Rodriguez PC, Toque HA et al. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. Physiol Rev. 2018;98:641–65.

Calogero S, Gardan R, Glaser P et al. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. J Bacteriol. 1994;176:1234–41.

Campbell EA, Kamath S, Rajashankar KR, et al. Crystal structure of *Aquifex aeolicus* σN bound to promoter DNA and the structure of σN-holoenzyme. Proc Natl Acad Sci USA. 2017, 114, E1805–E1814.

Challis GL, Ravel J. 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. 2000;187(2):111-114.

Chang C, Evdokimova E, Mcchesney M, et al. Crystal structure of Arginase from *Bacillus cereus*. 2018. No publicado.

Chaulagain D, Frugoli J. The regulation of nodule number in legumes is a balance of three signal transduction pathways. Int J Mol Sci. 2021;22, 1117.

Chen S, Calvo JM. Leucine-induced dissociation of *Escherichia coli* Lrp hexadecamers to octamers. J Mol Biol. 2002;318(4):1031-1042.

Cho BK, Federowicz S, Park YS, Zengler K, et al. Deciphering the transcriptional regulatory logic of amino acid metabolism. Nat Chem Biol. 2011;8(1):65-71.

Cho K, Winans SC. The putA gene of *Agrobacterium tumefaciens* is transcriptionally activated in response to proline by an Lrp-like protein and is not autoregulated. Mol Microbiol. 1996;22(5):1025-1033.

Chou HT, Kwon D-H, Hegazy M, et al. Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Bacteriol. 2008;190:1966–75.

Christianson DW. Arginase: structure, mechanism, and physiological role in male and female sexual arousal. Acc Chem Res. 2005;38:191–201.

Calogero S, Gardan R, Glaser P, et al. RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. J Bacteriol. 1994;176(5):1234-41.

Di Costanzo L, Sabio G, Mora A, et al. Crystal structure of human arginase I at 1.29-A resolution and exploration of inhibition in the immune response. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(37):13058-13063.

Dunn MF. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. Crit Rev Microbiol. 2015;41(4):411-51.

Cozzone AJ .2010. Proteins: Fundamental Chemical Properties. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. 2010.

Cunin R, Glandsdorff N, Piérard A et al. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. Microbiol Rev. 1986;50:314–52.

Cusumano ZT, Caparon MG. Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F1Fo-ATPase. J Bacteriol. 2015;197(7):1288-96.

Czaplewski LG, North AK, Smith MC et al. Purification and initial characterization of AhrC: the regulator of arginine metabolism genes in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 1992;6:267–75.

D'Hooghe I, Vander Wauven C, Michiels J, et al. The arginine deiminase pathway in *Rhizobium etli*: DNA sequence analysis and functional study of the arcABC genes. J Bacteriol. 1997;179:7403–9.

de los Rios S, Perona JJ. Structure of the *Escherichia coli* leucine-responsive regulatory protein Lrp reveals a novel octameric assembly. J Mol Biol. 2007;366(5):1589-1602.

Débarbouillé M, Martin-Verstraete I, Kunst F, Rapoport G. The *Bacillus subtilis* sigL gene encodes an equivalent of sigma 54 from gram-negative bacteria. Proc Natl Acad Sci USA. 1991;15;88(20):9092-6.

Dennis C CA, Glykos NM, Parsons MR et al. The structure of AhrC, the arginine repressor/activator protein from *Bacillus subtilis*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2002;58(Pt 3):421-30.

Di Martino ML, Campilongo R, Casalino M et al. Polyamines: emerging players in bacteria-host interactions. Int J Med Microbiol. 2013;303(8):484-91.

Díaz R, Vargas-Lagunas C, Villalobos MA, et al. argC orthologs from rhizobiales show diverse profiles of transcriptional efficiency and functionality in *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol. 2011;193(2):460-472.

diCenzo GC, Finan TM. Genetic redundancy is prevalent within the 6.7 Mb *Sinorhizobium meliloti* genome. Mol Genet Genomics. 2015;290(4):1345-1356.

Dizikes GJ, Grody WW, Kern RM et al. Isolation of human liver arginase cDNA and demonstration of nonhomology between the two human arginase genes. Biochem Biophys Res Commun. 1986;26;141(1):53-9.

Dowling DP, Di Costanzo L, Gennadios HA et al. Evolution of the arginase fold and functional diversity. Cell Mol Life Sci. 2008;65:2039–55.

Downie JA. Legume nodulation. Curr Biol. 2014;24(5):R184-R190.

Dunn MF. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. Crit Rev Microbiol. 2014;41:411–51.

Dzik JM. Evolutionary roots of arginase expression and regulation. Front Immunol. 2014;7;5:544.

Esseling JJ, Lhuissier FG, Emons AM. Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. Plant Physiol. 2003;132(4):1982-1988.

Fan CL, Rodwell VW. Physiological consequences of starvation in *Pseudomonas putida*: degradation of intracellular protein and loss of activity of the inducible enzymes of L-arginine catabolism. J Bacteriol. 1975;124(3):1302-11.

Fernández-López M, D'Haeze W, Van Montagu M et al. Changes in the glycosylation pattern at the reducing end of azorhizobial Nod factors affect nodulation efficiency. FEMS Microbiology Letters, 1998;158, 237– 242.

Ferraioli S, Taté R, Caputo E et al. The *Rhizobium etli* argC gene is essential for arginine biosynthesis and nodulation of Phaseolus vulgaris. Mol Plant Microbe Interact. 2001;14(2):250-254.

Fisher RF, Long SR. Rhizobium-plant signal exchange. Nature. 1992;357(6380):655-660.

Füser G, Steinbüchel A. Analysis of genome sequences for genes of cyanophycin metabolism: identifying putative cyanophycin metabolizing prokaryotes. Macromol Biosci. 2007;7:278–96.

García D, Uribe E, Salgado M et al. Mutagenic and kinetic support for an allosteric site in arginase from the extreme thermophile *Bacillus caldovelox*, which allows activation by arginine. Biochimie. 2015;108:8-12.

Gardan R, Raporport G, Débarbouillé M. Expression of the rodDEF operon involved in arginine catabolism in *Bacillus subtilis*. J Mol Biol. 1995;249:843–56.

Gardan R, Raporport G, Débarbouillé M. Role of the transcriptional activator RocR in the arginine-degradation pathway of *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 1997;24:825–37.

Garnett JA, Baumberg S, Stockley PG et al. A high-resolution structure of the DNA-binding domain of AhrC, the arginine repressor/activator protein from *Bacillus subtilis*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. 2007;63:914–7.

Ghochikyan A, Karaivanova IM, Lecocq M et al. Arginine operator binding by heterologous and chimeric ArgR repressors from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. J Bacteriol. 2002;184(23):6602-14.

Glyde R, Ye F, Darbari VC et al. Structures of RNA polymerase closed and intermediate complexes reveal mechanisms of DNA opening and transcription initiation. Mol Cell. 2017;6;67(1):106-116.e4.

Gong S, Richard H, Foster JW. YjdE (AdiC) is the arginine:agmatine antiporter essential for arginine-dependent acid resistance in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2003;185(15):4402-4409.

Hernández VM. Caracterización genética y bioquímica de la regulación de la biosíntesis de la L-arginina en *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. Ph.D. Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, 2020:103.

Hernández VM, Girard L, Hernández-Lucas I et al. Genetic and biochemical characterization of arginine biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti* 1021. Microbiology. 2015;161:1671–82.

Hernández VM, Arteaga A, Dunn MF. Diversity, properties and functions of bacterial arginases, FEMS Microbiology Reviews. 2021;fuab034.

Hong E, Doucleff M, Wemmer DE. Structure of the RNA polymerase core-binding domain of sigma(54) reveals a likely conformational fracture point. J Mol Biol. 2009;390(1):70-82.

Hwangbo SA, Kim JW, Jung S-J et al. Characterization of a dimeric arginase from *Zymomonas mobilis* ZM4. Front Microbiol. 2019;10:2755.

Itoh Y. Cloning and characterization of the aru genes encoding enzymes of the catabolic arginine succinyltransferase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 1997;179(23):7280-7290.

Jafri S, Evoy S, Cho K et al. An Lrp-type transcriptional regulator from *Agrobacterium tumefaciens* condenses more than 100 nucleotides of DNA into globular nucleoprotein complexes. J Mol Biol. 1999;21;288(5):811-24.

Jann A, Matsumoto H, Haas D. The fourth arginine catabolic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. J Gen Microbiol. 1988;134(4):1043-53.

d-Majd F, Blanchard JS. Mechanistic analysis of the argE-encoded N-acetylornithine deacetylase. Biochemistry. 2000;15;39(6):1285-93.

Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1996;114:107–32.

Joly N, Zhang N, Buck M et al. Coupling AAA protein function to regulated gene expression. Biochim Biophys Acta. 2012;1823(1):108-16.

Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE et al. Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. Nature. 1996;383:554–7.

Kerppola TK, Kahn ML. Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. J Gen Microbiol. 1988a;134:913–19.

Kerppola TK, Kahn ML. Genetic analysis of carbamoylphosphate synthesis in *Rhizobium meliloti* 104A14. J Gen Microbiol. 1988b;134:921–9.

Keuntje B, Masepohl B, Klipp W. Expression of the putA gene encoding proline dehydrogenase from *Rhodobacter capsulatus* is independent of NtrC regulation but requires an Lrp-like activator protein. J Bacteriol. 1995;177(22):6432-9.

Khangulov SV, Sossong TM Jr, Ash DE et al. L-arginine binding to liver arginase requires proton transfer to gateway residue His141 and coordination of the guanidinium group to the dimanganese(II,II) center. Biochemistry. 1998;37:8539–50.

Klingel U, Miller CM, North AK et al. A binding site for activation of the *Bacillus subtilis* AhrC protein, a repressor/activator of arginine metabolism. Mol Gen Genet. 1995;248:329–40.

Kölling R, Lother H. AsnC: an autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1985;164(1):310-315.

Kondorosi E, Mergaert P, Kereszt A. A paradigm for endosymbiotic life: Cell differentiation of Rhizobium bacteria provoked by host plant factors. Annu Rev Microbiol. 2013,67,611–628.

Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. pH-sensitive control of arginase by Mn(II) ions at submicromolar concentrations. Arch Biochem Biophys. 1991;286(1):217-21.

Kuhn NJ, Talbot J, Ward S. pH-sensitive control of arginase by Mn(II) ions at submicromolar concentrations. Arch Biochem Biophys. 1991;286(1):217-221.

Kuhn NJ, Ward S, Piponski M et al. Purification of human hepatic arginase and its manganese (II)-dependent and pH-dependent interconversion between active and inactive forms: a possible pH-sensing function of the enzyme on the ornithine cycle. Arch Biochem Biophys. 1995;320(1):24-34.

Kumar A, Vij N, Randhawa GS. Isolation and symbiotic characterization of transposon Tn5-induced arginine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. Indian J Exp Biol. 2003;41:1198–204.

Lemmens L, Maklad HR, Bervoets I, Peeters E. Transcription regulators in Archaea: Homologies and differences with bacterial regulators. J Mol Biol. 2019;431(20):4132-4146.

Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C. How Ralstonia solanacearum exploits and thrives in the flowing plant xylem environment. Trends Microbiol. 2018;26(11):929-942.

Lu CD, Abdelal AT. Role of ArgR in activation of the ast operon, encoding enzymes of the arginine succinyltransferase pathway in Salmonella typhimurium. J Bacteriol. 1999;181(6):1934-8.

Lu CD, Houghton JE, Abdelal AT. Characterization of the arginine repressor from *Salmonella typhimurium* and its interactions with the carAB operator. J Mol Biol. 1992;225(1):11-24.

Lu CD. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. Appl Microbiol Biotechnol. 2006;70:261–72.

Maghnouj A, de Sosua Cabral TF, Stalon V et al. The arcABCD gene cluster, encoding the arginine deiminase pathway of *Bacillus licheniformis*, and its activation by the arginine repressor argR. J Bacteriol. 1998;180:6468–75.

Marc F, Weigel P, Legrain C, et al. Characterization and kinetic mechanism of mono- and bifunctional ornithine acetyltransferases from thermophilic microorganisms. Eur J Biochem. 2000;267(16):5217-5226.

McGee DJ, Zabaleta J, Viator RJ et al. Purification and characterization of *Helicobacter pylori* arginase, RocF: unique features among the arginase superfamily. Eur J Biochem. 2004;271:1952–62.

Mendz GL, Holmes EM, Ferrero RL. In situ characterization of *Helicobacter pylori* arginase. Biochim Biophys Acta. 1998 Nov 10;1388(2):465-77.

Michael AJ. Polyamines in Eukaryotes, Bacteria, and Archaea. J Biol Chem. 2016;291(29):14896-903.

Miller CM, Baumberg S, Stockley PG. 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. 1997;26(1):37-48.

Mishima E, Hosokawa A, Imaizumi-Anraku H, Saito K, Kawaguchi M, Saeki K. Requirement for *Mesorhizobium loti* ornithine transcarbamoylase for successful symbiosis with Lotus japonicus as revealed by an unexpected long-range genome deletion. Plant Cell Physiol. 2008;49(3):301-313.

Nakamura N, Fujita M, Kimura K. Purification and properties of L-arginase from *Bacillus subtilis*. Agric Biol Chem. 1973;37:2827–33.

Naumoff DG, Xu Y, Glansdorff N, Labedan B. Retrieving sequences of enzymes experimentally characterized but erroneously annotated: the case of the putrescine carbamoyltransferase. BMC Genomics. 2004;5(1):52.

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL et al. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. Genome Res. 1999;9(1):27-43.

Newman EB, Lin R. Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. Annu Rev Microbiol. 1995;49:747-75.

Newman EB, D'Ari R, Lin RT. The leucine-Lrp regulon in E. coli: a global response in search of a raison d'être. Cell. 1992;21;68(4):617-9.

Novák L, Zubáčová Z, Karnkowska A et al. Arginine deiminase pathway enzymes: evolutionary history in metamonads and other eukaryotes. BMC Evol Biol. 2016;16(1):197.

Oke V, Long SR. Bacteroid formation in the Rhizobium-legume symbiosis. Curr Opin Microbiol. 1999;2(6):641-646. doi:10.1016/s1369-5274(99)00035-1 .

Oldroyd GE, Downie JA. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004;5(7):566-576.

Osuna J, Soberón X, Morett E. A proposed architecture for the central domain of the bacterial enhancer-binding proteins based on secondary structure prediction and fold recognition. Protein Sci. 1997;6(3):543-555.

Park YW, Kang J, Yeo HK et al. Structural analysis and insights into the oligomeric state of an arginine-dependent transcriptional regulator from *Bacillus halodurans*. PLoS One. 2016;11:e0155396.

Peng Q, Wang G, Liu G et al. Identification of metabolism pathways directly regulated by sigma(54) factor in *Bacillus thuringiensis*. Front Microbiol. 2015;12;6:407.

Quintero MJ, Muro-Pastor A, Herrero A et al. Arginine catabolism in the Cyanobacterium Synechocystis sp. Strain PCC 6803 involves the urea cycle and arginase pathway. J Bacteriol. 2000;182:1008–15.

Randhawa GS, Hassani R. Role of rhizobial biosynthetic pathways of amino acids, nucleotide bases and vitamins in symbiosis. Indian J Exp Biol. 2002;40(7):755-764.

Reczowski RS, Ash DE. EPR evidence of binuclear Mn(II) centers in rat liver arginase. J Am Chem Soc. 1992;114:10992–4.

Reczkowski RS, Ash DE. Rat liver arginase: kinetic mechanism, alternate substrates, and inhibitors. Arch Biochem Biophys. 1994;312:31–7.

Richard H, Foster JW. Escherichia coli glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. J Bacteriol. 2004;186(18):6032-6041.

Robbel L, Helmetag V, Knappe TA et al. Consecutive enzymatic modification of ornithine generates the hydroxamate moieties of the siderophore erythrochelin. Biochemistry. 2011;50:6073–80.

Rodríguez-García A, Ludovice M, Martin JF et al. Arginine boxes and the argR gene in *Streptomyces clavuligerus*: evidence for a clear regulation of the arginine pathway. Mol Microbiol. 1997;25:219–28.

Ruepp A, Soppa J. Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarium* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the arcRACB gene cluster. J Bacteriol. 1996;178(16):4942-4947.

Schneider BL, Kiupakis AK, Reitzer LJ. Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1998;180:4278–86.

Schumacher J, Zhang X, Jones S et al. ATP-dependent transcriptional activation by bacterial PspF AAA+protein. J Mol Biol. 2004;14;338(5):863-75.

Shi D, Sagar V, Jin Z et al. The crystal structure of N-acetyl-L-glutamate synthase from *Neisseria gonorrhoeae* provides insights into mechanisms of catalysis and regulation. J Biol Chem. 2008;14;283(11):7176-84..

Shi D, Li Y, Cabrera-Luque J et al. A novel N-acetylglutamate synthase architecture revealed by the crystal structure of the bifunctional enzyme from *Maricaulis maris*. PLoS One. 2011;6(12):e28825.

Sohlenkamp C. Ornithine lipids and other amino acid-containing acyloxyacyl lipids. In: Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Cham: Springer International Publishing, 2019, 1–14.

Song W, Niu P, Chen X et al. Enzymatic production of L-ornithine from L-arginine with recombinant thermophilic arginase. J Mol Catal B: Enzym. 2014;110:1–7.

Song JY, Jensen SE, Lee KJ. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;88:659–69.

Sossong Jr T, Khangulov S, Cavalli R. et al. Catalysis on dinuclear Mn(II) centers: hydrolytic and redox activities of rat liver arginase. JBIC. 1997;2, 433–443.

Sprent JI. 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing?. J Exp Bot. 2008;59(5):1081-1084.

Sprent JI. An interdisciplinary look at legumes and their bacterial symbionts: some thoughts from Big Sky. New Phytol. 2009;184(1):15-17.

Srivastava A, Sau AK. Biochemical studies on *Helicobacter pylori* arginase: insight into the difference in activity compared to other arginases. IUBMB Life. 2010;62:906–15.

Srivastava A, Meena SK, Alam M et al. Structural and functional insights into the regulation of *Helicobacter pylori* arginase activity by an evolutionary nonconserved motif. Biochemistry. 2013;52:508–19.

Sunnerhagen M, Nilges M., Otting G et al. Solution structure of the DNA-binding domain and model for the complex of multifunctional hexameric arginine repressor with DNA. Nat Struct Biol. 1997;4:819–26.

Surowitz KG, Titus JA, Pfister RM. Effects of cadmium accumulation on growth and respiration of a cadmium-sensitive strain of *Bacillus subtilis* and a selected cadmium resistant mutant. Arch Microbiol, 1985;140:107–112.

Tani TH, Khodursky A, Blumenthal RM et al. Adaptation to famine: a family of stationary-phase genes revealed by microarray analysis. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;15;99(21):13471-6.

Tricot C, Stalon V, Legrain C. Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* mutants affected in arginine, ornithine and citrulline catabolism: function of the arginine oxidase and arginine succinyltransferase pathways. J Gen Microbiol. 1991;137(12):2911-2918.

Vanderbilt AS, Gaby NS, Rodwell VW. Intermediates and enzymes between alpha-ketoarginine and gamma-guanidinobutyrate in the L-arginine catabolic pathway of *Pseudomonas putida*. J Biol Chem. 1975 Jul 25;250(14):5322-9.

Vargas-Lagunas C, Mora Y, Díaz R, et al. Overproduction of *Sinorhizobium meliloti* ArgC (N-acetyl-gamma-glutamyl phosphate reductase) promotes growth delay and inefficient nodules. FEMS Microbiol Lett. 2017;364(23):10.1093/femsle/fnx233.

Velaźquez-Libera JL, Caballer J, Tuñoń I et al. On the nature of the enzyme–substrate complex and the reaction mechanism in human arginase I. A combined molecular dynamics and QM/MM study. ACS Catalysis. 2020;10:8321–33.

Verhoogt HJ, Smit H, Abee T, et al. arcD, the first gene of the arc operon for anaerobic arginine catabolism in Pseudomonas aeruginosa, encodes an arginine-ornithine exchanger. J Bacteriol. 1992;174(5):1568-1573.

Viator JR, Rest RF, Hildebrandt E et al. Characterization of *Bacillus anthracis* arginase: effects of pH, temperature, and cell viability on metal preference. BMC Biochem. 2008;9:1–14.

Villaseñor T, Brom S, Da´valos A et al. Housekeeping genes essential for pantothenate biosynthesis are plasmid-encoded in Rhizobium etli and *Rhizobium leguminosarum*. BMC Microbiol. 2011;11:66.

Vockley JG, Goodman BK, Tabor DE et al. Loss of function mutations in conserved regions of the human arginase I gene. Biochem Mol Med. 1996;59(1):44-51.

Vollmer W. Bacterial outer membrane evolution via sporulation? Nat Chem Biol. 2011;15;8(1):14-8.

Wang D, Yang S, Tang F et al Symbiosis specificity in the legume: rhizobial mutualism. Cell Microbiol. 2012;14(3):334-342.

Xie F, Murray JD, Kim J, et al. Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109(2):633-638.

Xu Y, Lebedan B, Glansdorff N. Surprising arginine biosynthesis: a reappraisal of the enzymology and evolution of the pathway in microorganisms. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71:36–47.

Yang Y, Darbari VC, Zhang N et al. Structures of the RNA polymerase-σ54 reveal new and conserved regulatory strategies. Science. 2015;21;349(6250):882-5.

Zaprasis A, Hoffmann T, Wünsche G et al. Mutational activation of the RocR activator and of a cryptic rocDEF promoter bypass loss of the initial steps of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. Environ Microbiol. 2014;16:701–17.

Zarei, I. Biosynthesis of bacitracin in stirred fermenter by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. Mod. Appl. Sci. 2012,6:30–36.

Zhang J, Zhang X, Li D, Hu Y et al. Crystal structure of *Helicobacter pylori* arginase. 2012. No publicado

Zhang T, Guo Y, Zhang H et al. Arginase from *Bacillus thuringiensis* SK 20.001: purification, characteristics, and implications for L-ornithine biosynthesis. Process Biochem. 2013;48:663–8.

Zhang J, Zhang X, Wu C et al. Expression, purification and characterization of arginase from *Helicobacter pylori* in its apo form. PLoS One. 2011;6:e26205.

Zúñiga M, Pérez G, González-Candelas F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. Mol Phylogenet Evol. 2002;25(3):429–444.