

Tesis Doctoral

Estudio de las enzimas implicadas en la biosíntesis de arginina en plantas

José Alberto Urbano Gámez

Programa de Doctorado en Biología
Celular y Molecular

Director: Francisco M. Cánovas Ramos
Codirector: Fernando N. de la Torre Fazio

Facultad de Ciencias
Universidad de Málaga


2022





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTOR: José Alberto Urbano Gámez

 <https://orcid.org/0000-0003-2726-0438>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es





FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y
BIOQUÍMICA

TESIS DOCTORAL

Estudio de las enzimas implicadas
en la biosíntesis de arginina en
plantas

José Alberto Urbano Gámez

2022



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña JOSÉ ALBERTO URBANO GÁMEZ

Estudiante del programa de doctorado BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR de la Universidad de Málaga, autor/a de la tesis, presentada para la obtención del título de doctor por la Universidad de Málaga, titulada: ESTUDIO DE LAS ENZIMAS IMPLICADAS EN LA BIOSÍNTESIS DE ARGININA EN PLANTAS

Realizada bajo la tutorización de FRANCISCO M. CÁNOVAS RAMOS y dirección de FRANCISCO M. CÁNOVAS RAMOS Y FERNANDO N. DE LA TORRE FAZIO (si tuviera varios directores deberá hacer constar el nombre de todos)

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse en caso de plagio de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 27 de JULIO de 2022

URBANO
GAMEZ JOSE
ALBERTO -

CANOVAS RAMOS
FRANCISCO MIGUEL

CANOVAS RAMOS
FRANCISCO MIGUEL

DE LA TORRE
FAZIO
FERNANDO
NICOLAS -



FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOQUÍMICA

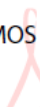
El Prof. Francisco M. Cánovas Ramos, Catedrático del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, y el Prof. Fernando N. de la Torre Fazio, Profesor Titular del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga, CERTIFICAN:

Que D. José Alberto Urbano Gámez ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo de investigación recogido en esta memoria de tesis doctoral, con el título original “Estudio de las enzimas implicadas en la biosíntesis de arginina en plantas”.

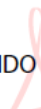
Tras la revisión de la presente memoria, se ha estimado oportuna su presentación ante la Comisión de Evaluación correspondiente, por lo que autorizamos su exposición y defensa para optar al grado de Doctor en Biología.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Málaga, a 27 de Julio de 2022.

CANOVAS RAMOS
FRANCISCO
MIGUEL -



DE LA TORRE
FAZIO FERNANDO
NICOLAS -



Reporte de similitud



Identificación de reporte de similitud: oid:31013:119301979

NOMBRE DEL TRABAJO

Manuscrito_Tesis_Alberto_Urbano_edicion_junio.docx

AUTOR

José Alberto Urbano Gámez

RECuento DE PALABRAS

25517 Words

RECuento DE CARACTERES

139583 Characters

RECuento DE PÁGINAS

149 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

15.2MB

FECHA DE ENTREGA

Jul 15, 2022 7:35 PM GMT+2

FECHA DEL INFORME

Jul 15, 2022 7:55 PM GMT+2

● 19% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 19% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 13% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 8 palabras)
- Material citado

Resumen

Los trabajos presentados en este trabajo de tesis doctoral han sido financiados a través de las siguientes fuentes:

- Proyecto RTI2018-094041-B-I00, Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Programa Operativo de Empleo Juvenil vía Sistema Nacional de Garantía Juvenil, FEDER, FSE, Junta de Andalucía.
- Fondos procedentes del grupo BIO-114.

Agradecimientos

Quiero comenzar mostrando mi agradecimiento a mi tutor y director de Tesis Francisco M. Cánovas, catedrático de la Universidad de Málaga, que durante muchos años ha liderado el grupo de estudio del metabolismo del nitrógeno en plantas, como atestiguan las numerosas publicaciones del grupo, y que me dio la oportunidad de comenzar este proyecto de Tesis Doctoral que finaliza con el presente trabajo.

Agradecer también enormemente la labor de codirección de esta Tesis a Fernando de la Torre Fazio, profesor titular de la Universidad de Málaga, por su disponibilidad, sugerencias y por la confianza depositada en mí para desarrollar este trabajo, muchas gracias Fer.

Hacer un agradecimiento especial al Dr. Jorge El-Azaz, por su inestimable ayuda durante el diseño de los experimentos y el desarrollo de los mismos. Fueron muchas horas e innumerables intentos de puesta a punto. Mi más sincero agradecimiento por tu ayuda.

Agradecer a todos aquellos que formaron parte del ecosistema del laboratorio, dando vida a poyatas y horas de laboratorio que de otra forma se harían eternas. Mucha gracias a Cañas, Belén, César, Josemi, Paco, Reme, Cristina, Juan Antonio, Concha, Mayte y Vanessa.

También quiero aprovechar esta oportunidad para agradecer a los compis de microbiología Álvaro, Irene, Zahira, Laura, Guti, Isa y Yandi. Muchas gracias a todos por ser compañeros dentro y fuera de la torre.

Quiero agradecer especialmente a Alejandra, me has demostrado una amistad muy bonita, que espero que nunca termine. Muchas gracias por estar siempre.

A mis mejores amigos de muchos años, Sergio, Adri, Fran. Muchas gracias por escucharme durante estos años, ayudarme a desconectar y mostrarme vuestro apoyo a lo largo de este camino.

A mi amiga Natasha, ambos comenzamos nuestros caminos con el mismo destino, la Tesis Doctoral, pero a miles de kilómetros de distancia. A pesar de ello, hemos mantenido el contacto, nos hemos

apoyado y estamos a punto de alcanzar nuestra meta. Eres una persona increíble, muchas gracias por todo.

A Patri, por todas las muestras de apoyo y cariño durante este tiempo. No hace mucho que nos conocimos, pero he descubierto una gran persona durante estos años y hemos forjado una bonita amistad. Espero que sea así por muchos años más. Muchas gracias por todo.

Por último, pero lo más importante, agradecer a mi familia, en especial a mis padres Rafael y Ana Gloria, por todos estos años de apoyo. Desde mi primer día de vida hasta hoy habéis estado mostrándome vuestro cariño y nunca dejando que me rinda. Muchísimas gracias de corazón.

Y a mi hermano, Jesús David, eres inteligente, divertido, amable, considerado, en resumen, una persona increíble. No solo das el 100% a nivel profesional, también a nivel personal, te preocupas por los que están a tu alrededor incluso más que de ti mismo y eso demuestra que lo valioso que eres en la vida de los demás. Espero tenerte siempre cerca.

Índice

Introducción.	13
Objetivos.	39
Material y métodos.	41
Resultados.	61
1. Búsqueda, identificación y clonación de los genes correspondientes a las enzimas OTC, ASSY, y ASL.	62
2. Niveles de expresión de los genes de OTC, ASSY y ASL en diferentes organismos y tejidos.	64
3. Estructura tridimensional de las proteínas OTC, ASSY y ASL.	73
4. Cálculo de las masas moleculares de las proteínas OTC, ASSY y ASL de <i>Pinus pinaster</i> .	80
5. Parámetros cinéticos de las proteínas OTC, ASSY y ASL de <i>Pinus pinaster</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Marchantia polymorpha</i> y <i>Physcomitrium patens</i> .	81
6. Efectos de diferentes metabolitos sobre la actividad de las enzimas recombinantes OTC, ASSY y ASL de <i>Pinus pinaster</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Marchantia polymorpha</i> y <i>Physcomitrium patens</i> .	88
7. Estudio de líneas mutantes para los genes <i>otc</i> , <i>assy</i> y <i>asl</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	98

Discusión.	105
1. Búsqueda e identificación de los genes codificantes para las enzimas OTC, ASSY y ASL.	106
2. Niveles de expresión de los genes. correspondientes a las enzimas OTC, ASSY y ASL en diferentes organismos y tejidos.	110
3. Estructura tridimensional de las proteínas OTC, ASSY y ASL.	113
4. Cálculo de las masas moleculares de las proteínas OTC, ASSY y ASL de <i>Pinus pinaster</i> .	115
5. Parámetros cinéticos de las proteínas OTC, ASSY y ASL de <i>Pinus pinaster</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Marchantia polymorpha</i> y <i>Physcomitrium patens</i> .	117
6. Efectos de diferentes metabolitos sobre la actividad de las enzimas recombinantes OTC, ASSY y ASL de <i>Pinus pinaster</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Marchantia polymorpha</i> y <i>Physcomitrium patens</i> .	123
7. Estudio de líneas mutantes para los genes <i>otc</i> , <i>assy</i> y <i>asl</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	127
8. Discusión general.	128
Conclusiones.	131
Referencias.	133

Introducción

Introducción.

El nitrógeno es un elemento esencial para la vida tal y como se conoce en el planeta Tierra. Presente en todos los organismos, es un componente fundamental de los aminoácidos y bases nitrogenadas, necesarios para construir macromoléculas de proteínas y ácidos nucleicos, adenosin trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) (Buren y Rubio, 2017), y también de moléculas como hormonas, vitaminas, clorofilas y componentes de la pared celular. El metabolismo del nitrógeno en las plantas es un campo de estudio muy relevante, pues los vegetales constituyen la base de la red trófica y han sido alimentos básicos en la dieta de todas las civilizaciones humanas. A principios del siglo XX, con la invención del proceso Haber-Bosch, la agricultura experimentó un gran desarrollo, pues se generó una fuente de nitrógeno accesible para las plantas que podía obtenerse a niveles industriales, como son el amonio (NH_4^+) y su forma oxidada, el nitrato (NO_3^-). Con ello, los campos de cultivo fueron “inundados” con grandes cantidades de nitrógeno inorgánico, para un aumento del rendimiento de la producción agronómica. El exceso de estos aportes nitrogenados ha conllevado problemas medioambientales como la eutrofización, que, aunque puede ocurrir de forma natural, ha aumentado debido a la acción del hombre (Glibert, 2017). Esta contaminación de grandes masas de agua necesarias para el mantenimiento de los ecosistemas y para el abastecimiento de las poblaciones ha afectado de forma grave a la fauna y flora que habitan en dichas aguas. De ahí la importancia de su estudio, pues conocer los mecanismos que usan las plantas para gestionar el nitrógeno es fundamental para optimizar el crecimiento de los cultivos sin dañar el

Introducción.

medio ambiente en el que se encuentran, alcanzando el equilibrio entre producción agrícola e impacto ambiental.

El nitrógeno se encuentra de forma muy abundante en la atmósfera, donde es el gas mayoritario en su forma N_2 (78%) seguido por el O_2 , en mucho menor porcentaje (21%) (www.esa.int). Sin embargo, las plantas terrestres no pueden acceder a este gran reservorio de nitrógeno, debido a que no tienen ningún mecanismo propio para captar el dinitrógeno. Para ello, algunas especies se sirven de mecanismos de simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno molecular, como puede ser el caso del género *Ensifer* (syn. *Sinorhizobium*), endosimbiontes del género *Medicago*. El proceso de endosimbiosis es facultativo y se dispara cuando la planta hospedadora presenta escasez nutricional de nitrógeno, pues es la planta, y no el simbionte, quien inicia el proceso (Oldroyd, 2013). A partir del metabolismo de estas bacterias fijadoras, se generan moléculas de nitrógeno inorgánico en forma de amonio, que es captado por la planta hospedadora y se incorpora en aminoácidos como la glutamina o la asparagina, para ser transportado por toda la planta (Lindström y Mousavi, 2020). A partir de amonio, por un proceso denominado nitrificación, las bacterias nitrificantes pueden generar nitrato. Por lo general, las plantas incorporan nitrato antes que amonio, pero depende en gran medida de la relación NH_4^+/NO_3^- , pues incorporarán la forma más abundante en el medio. Esta preferencia puede cambiar dependiendo tanto del estado de desarrollo de la planta, como del estado fisiológico (Daryanto et al., 2018).



Figura I1. Ciclo del nitrógeno simplificado donde se muestran las diferentes especies de nitrógeno y los principales procesos implicados en su transformación.

Mayoritariamente, la incorporación de amonio ocurre a través del ciclo GS-GOGAT (Cánovas et al., 1998; Muro-Pastor et al., 2005; Ishizaki et al., 2010; Liu et al., 2021), utilizando el amonio incorporado para la síntesis de glutamina a partir de glutamato. En el caso del nitrato, primero se reduce a amonio, y después se incorpora por el mismo ciclo GS-GOGAT. La incorporación ocurre principalmente a nivel radicular, pero también se producen la incorporación de moléculas inorgánicas de nitrógeno durante el intercambio gaseoso en los estomas, donde principalmente se capta nitrito (NO_2^-) que posteriormente también se transforma en amonio para incorporarlo en moléculas orgánicas. Esta última forma de incorporar nitrógeno constituye una parte muy pequeña en comparación con la incorporación desde la raíz (Hu et al., 2010).

Introducción.

Las plantas también pueden incorporar nitrógeno en forma orgánica como urea o aminoácidos, así como pequeños péptidos (Näsholm *et al.*, 2009; Schimel *et al.*, 1996). Durante la simbiosis con micorrizas, las plantas pueden tomar los péptidos producidos como resultado de la actividad de las proteasas que los hongos liberan al medio. Todas estas formas de nitrógeno son procesados interiormente y transformados según las necesidades de la planta.

Otra fuente de nitrógeno para las plantas son los tejidos senescentes. Una vez se comienza el proceso de senescencia, gran parte de los componentes celulares de los órganos y tejidos se reciclan y se distribuyen a tejidos en desarrollo o de reserva (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). En algunas especies vegetales, los tejidos de reserva de las semillas también son una fuente de nitrógeno y otros nutrientes durante la germinación, acumulado principalmente en proteínas de reserva, como ocurre en las coníferas o la soja.

El destino de este nitrógeno incorporado, transformado o reciclado es la síntesis de compuestos nitrogenados fundamentales, como bases nitrogenadas y aminoácidos. Las plantas son capaces de sintetizar todos los aminoácidos necesarios para su desarrollo, al contrario que los animales, que necesitan incorporar algunos en la dieta. Es por esa capacidad de producir moléculas esenciales para el ser humano por lo que las plantas constituyen un parte importante de la nutrición humana directa (agricultura) e indirecta (pesca y ganadería) y cada vez se dirige más atención y fondos a su estudio (Henkhaus *et al.*, 2020) (Davison y Ammann, 2017).

Introducción.

La arginina, descubierta por primera vez en 1887 (*Schulze y Steiger, 1887*) y cuyo nombre procede del griego *argentum*, por el color plateado de los cristales resultantes de su precipitación con sales de plata, es uno de los 20 aminoácidos que constituyen las proteínas. Este aminoácido se sintetiza tanto en plantas como en animales, por lo cual no se le da el carácter de “esencial”, como sí ocurre con el triptófano o la fenilalanina, por ejemplo. Una de las características principales de la arginina es su alto contenido en nitrógeno, pues contiene 4 átomos de este elemento en su estructura molecular, frente a 6 átomos de carbono (Figura I2). Uno de los cuatro átomos pertenece al grupo amino del carbono quiral, y los otros tres se localizan en el grupo guanidino de la cadena lateral. Este grupo guanidino le confiere también su carácter básico (pKa de la cadena lateral = 13.8).

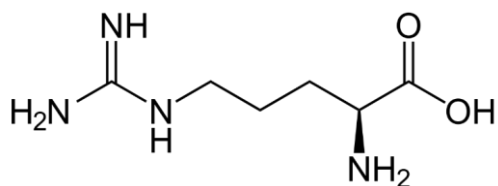


Figura I2. Representación de la molécula de arginina en su fórmula esquelética, donde se puede observar como 3 de los 4 átomos de nitrógeno se acumulan al final de la cadena lateral.

La arginina participa principalmente como parte de la estructura primaria de las proteínas, aunque puede tener diversos destinos metabólicos como la síntesis de poliaminas, óxido nítrico (ON), síntesis de urea y otros l-aminoácidos como prolina y glutamato. Las poliaminas interactúan a muchos niveles dentro de las células, con proteínas y material genético principalmente, dado que las poliaminas son compuestos cargados positivamente a pH fisiológico celular (Bae et al.,

Introducción.

2018), mientras que el material genético, por ejemplo, presenta carga negativa debido a los grupos PO_4^{3-} de su estructura.

La síntesis de poliaminas ocurre por dos vías, por descarboxilación de la ornitina mediante la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) (EC 4.1.1.17), dando lugar directamente a putrescina; y a partir de arginina, tras una serie de reacciones que comienzan con la descarboxilación de la arginina. La arginina descarboxilasa (ADC) (EC 4.1.1.19), da lugar a agmatina, que en dos reacciones posteriores (catalizadas por la agmatina iminohidrolasa (EC 3.5.3.12) y N-carbamoilputrescina aminohidrolasa (EC 3.5.1.53) generan putrescina, a partir de la cual se sintetizan las otras poliaminas principales: espermina, espermidina y termoespermina (Takano, 2012). En un artículo de Srivenugopal y Adiga (1981) se sugiere un acoplamiento de las reacciones ornitina transcarbamoilasa y N-carbamoilputrescina aminohidrolasa, mediante el cual, el grupo carbamoilo procedente de la N-carbamoilputrescina sería transferido directamente a la ornitina, para dar lugar así a citrulina, todo ello sería catalizado por el mismo multímero de N-carbamoilputrescina aminohidrolasa, asignando a esta última enzima una doble función, putrescina sintasa y citrulina sintasa.

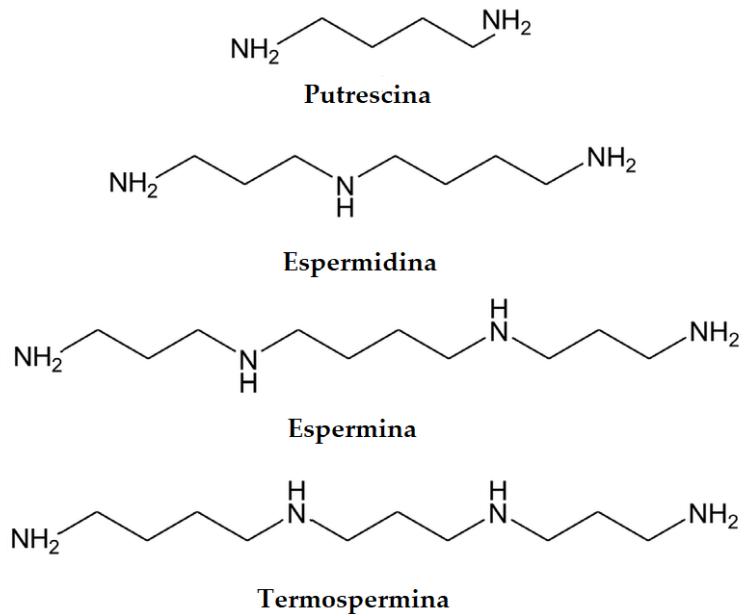


Figura I3. Estructura en fórmula esqueletal de las poliaminas derivadas de la molécula de arginina.

La vía de síntesis de poliaminas por descarboxilación de la arginina (ADC) está presente en bacterias y arqueas, además de plantas (Burrell et al., 2010), aunque la principal vía de síntesis de poliaminas ocurre por descarboxilación de la ornitina (ODC) (Gevrekci, 2017). En algunos grupos de plantas como las brassicáceas o *Physcomitrium patens* no hay vía de síntesis de poliaminas por ODC, de modo que la única vía de síntesis de poliaminas ocurre vía ADC (Hanfrey et al., 2001). Aun así, la mayoría de las plantas sintetizan poliaminas por ambas vías, dependiendo del estado fisiológico de la planta y del tejido en cuestión (Alcázar et al., 2018).

La síntesis de ON es un proceso bastante estudiado en humanos y otros animales, debido a su papel fundamental como hormona para la vasodilatación. En plantas, a pesar de haber pruebas de la presencia de

Introducción.

ON, aún hoy día no se ha determinado con claridad su mecanismo de síntesis, aunque se postula con la posibilidad de que ocurra el mismo proceso que en animales, a través de una vía oxidativa mediante las sintetasas de óxido nítrico a partir de arginina (Bredt, 1999), pero también a través de una vía reductiva, a partir de la reducción de nitrato (Astier et al., 2018). El ON en plantas actúa a diferentes niveles durante el desarrollo, en la germinación y durante la floración, en la muerte celular programada, en respuesta a estrés tanto biótico como abiótico (Groß et al., 2017) y participa también en la modificación postraduccional conocida como nitrosilación, en la cual se oxida un grupo tiol (-SH) de las cisteínas para generar un grupo S-nitrotiol. La S-nitrosilación puede alterar tanto la funcionalidad, estabilidad como la localización de la proteína modificada y sería la forma en la que el ON interviene en los procesos fisiológicos antes mencionados (Feng et al., 2019). Debido a su funcionalidad como vasodilatador en humanos, la síntesis de ON a partir de arginina se está probando como un remedio natural para la reducción del estrés, usando el té matcha, rico en arginina y teína, e incluyéndolo en la dieta como alternativa a tratamientos farmacológicos (Unno et al., 2019).

Cuando forma parte de la estructura primaria de las proteínas, la arginina puede ser diana de la enzima peptidil-arginina deiminasa (EC 3.5.3.15) dando lugar a citrulina, siendo esta una modificación postraduccional irreversible, también conocida como citrulinación. Esta modificación del grupo guanidino es muy importante, principalmente en las histonas, pues compite con el proceso de metilación de la

Introducción.

arginina, y también puede ocurrir en factores de transcripción, lo que en conjunto puede facilitar o reprimir la expresión de ciertos genes (Slade et al., 2015). A pesar de que el proceso de citrulinación es específico de argininas que forman parte de una proteína, el mismo mecanismo de conversión de arginina libre a citrulina mediante la enzima arginina deiminasa (EC 3.5.3.6) se ha descrito en microorganismos (Li et al., 2008) y hongos (El-Sayed et al., 2019), pero no así en animales o plantas.

Dado que la capacidad de conversión de arginina libre a citrulina no ocurre en humanos y que algunos tipos de tumores son dependientes de arginina externa, pues no expresan las enzimas argininosuccinato sintetasa (ASSY) y argininosuccinato liasa (ASL), desde hace algunos años se prueba con la enzima arginina deiminasa purificada como tratamiento contra estos tumores. Se ha determinado que reducir la cantidad de arginina circulante disponible provoca que estas células tumorales detengan el ciclo celular en fase G1 (El-Sayed et al., 2015).

Existe un grupo particular de proteínas que contienen en su secuencia numerosos residuos de arginina, las cuales actúan como reservorio de nitrógeno y por ello reciben el nombre de proteínas de reserva. Se depositan formando cuerpos proteicos rodeados de membrana, ya sean derivados del retículo endoplasmático, como ocurren en el maíz, o derivados de la vacuola (Müntz, 1998). Existen diversos grupos de proteínas con estas características, como son las albuminas, globulinas, prolaminas y glutelinas (Shewry et al, 1995), atendiendo a sus propiedades según el fraccionamiento de Osborne (Osborne, 1924). Se

Introducción.

encuentran en multitud de organismos vegetales, como en legumbres, cucurbitáceas, gramíneas (Rasheed et al., 2020) y coníferas (Allona et al., 1994), principalmente en el tejido nutricional junto al embrión en la semilla. Durante la germinación, estas proteínas son hidrolizadas por acción de endo- y exopeptidasas que son movilizadas a los cuerpos proteicos (Müntz et al., 2001) y la arginina liberada se degrada a urea, liberando el nitrógeno de su estructura molecular en forma de NH_4^+ , el cual se recicla mediante el ciclo GS-GOGAT (Cánovas et al., 1998), y en forma de glutamato y glutamina se envía a diferentes partes del organismo, según las necesidades de la planta.

Las coníferas son un grupo de plantas que presentan una alta cantidad de proteínas de reserva en su semilla y por ende una gran cantidad de arginina (2.25 g / 100 g de media (www.fdc.nal.usda.gov)) y han sido objeto de estudio desde hace bastante tiempo (Allona et al., 1992; Allona et al., 1994). Distribuidas casi a lo largo de todo el globo, son las especies vegetales más abundantes en los ecosistemas de taiga de Norte América y Eurasia, con especies representativas como pueden ser *Abies sibirica*, *Picea obovata*, *Pinus sibirica*, *Larix sibirica*, *Pinus sylvestris* y *Pinus pinaster* (Voltas et al., 2020) y de ellas nace la importancia económica de los bosques de coníferas, pues suponen una gran fuente de madera, materia prima para la construcción, papel y plásticos derivados de la pulpa de madera de estos árboles, así como piñones y gálbulos (pseudobayas), de interés nutricional, e incluso tienen interés ornamental y cultural, como ilustra el hecho de que uno de los elementos centrales de la Navidad, el árbol coronado por la estrella, es una conífera.

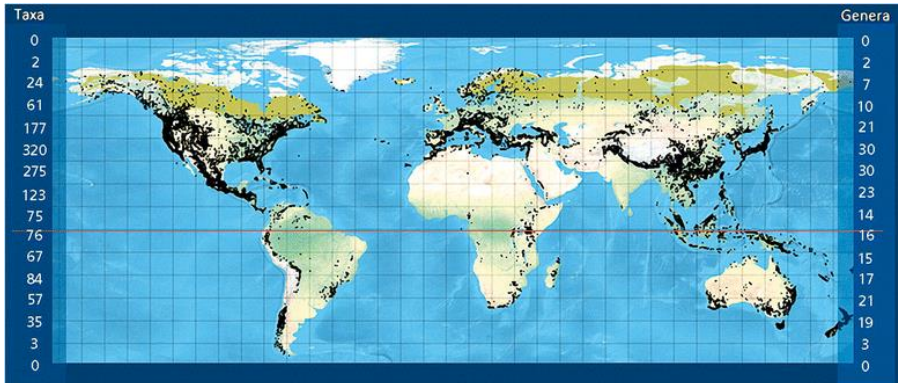


Figura I4. Distribución global de todas las especies de coníferas. Mapa EFR-2 en Farjon y Filer (2013).

El pino marítimo (*Pinus pinaster* Aiton), también denominado pino resinero, pino rodeno o pino negral, es una conífera que se encuentra ampliamente distribuida por la península ibérica, suroeste de Francia y noroeste de Italia, y de la que existen pequeñas poblaciones en los países de Túnez, Argelia, Marruecos, centro de Francia y Reino Unido (www.euforgen.org), aunque también se encuentra en otras latitudes en el hemisferio sur, donde se considera especie invasora (Núñez et al., 2017).

El pino marítimo es una conífera abundante en la península ibérica, puede llegar a alcanzar los 30-35 m de altura, con un color rojizo entre las escamas que forman la corteza, presenta también una piña alargada y acículas largas de hasta 15 cm. Aunque originalmente crecía en regiones cálidas y húmedas, su cultivo extensivo fuera de su hábitat natural ha ocasionado que aparezcan poblaciones capaces de resistir heladas y veranos secos, además de poder habitar suelos pobres en nutrientes.

Introducción.

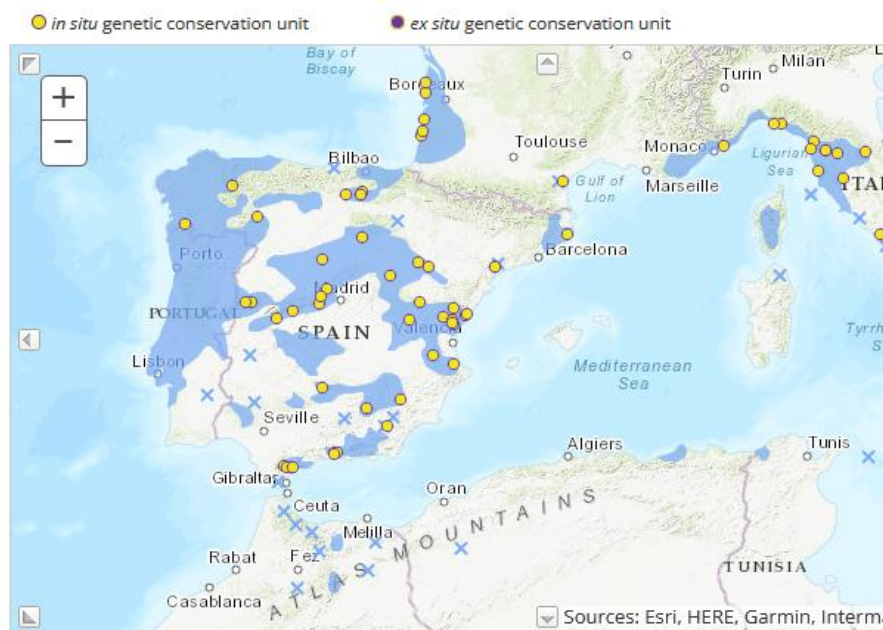


Figura I5. Distribución geográfica de las poblaciones de pino marítimo en el sur de Europa y norte de África. Fuente: www.euforgen.org

Con un rango de hábitat que va desde 0 hasta los 2000 m sobre el nivel del mar (Farjon y Filer, 2013), esta especie, entre otras, ha servido tanto para repoblar áreas montañosas como para el control de las dunas y la desertización, evitando su avance y conservando así ecosistemas de forma ecológica, tanto es así, que pueden constituir un peligro para los propios ecosistemas naturales de dunas (Choi et al., 2013).

Dada su relevancia ecológica y económica, el pino marítimo ha sido objeto de estudio en diferentes ámbitos, por su importancia ecológica (Sagra et al., 2018; Makineci, 2021), su desarrollo morfológico (Sellier y Fourcaud, 2005; Danjon et al., 2005; Valledor et al., 2021), su desarrollo poblacional (Vizcaino-Palomar et al., 2014; Moyano et al., 2020), diferentes respuestas ante patógenos (Lombardero et al., 2011; Gea-

Introducción.

Izquierdo et al., 2019), simbiosis radicular con hongos (Müller et al., 2007; Ali et al., 2009), nutrición (Cánovas et al., 2007; Ortigosa et al., 2020), metabolismo (Cañas et al., 2006; de la Torre et al., 2014; Llebrés et al., 2018) y el estudio de su transcriptoma (Fernández-Pozo et al., 2011; Canales et al., 2014; Cañas et al., 2015; Rodrigues et al., 2019).



Figura I6. Ejemplar adulto de *Pinus pinaster* procedente de la península ibérica. Fuente: "Sierra Bermeja, Spain - Maritime Pine" por martin_vmorris CC BY-SA 2.0.

Por su demanda en la industria maderera, cada vez se han dedicado más extensiones de terreno al cultivo intensivo de pino marítimo buscando optimizar sus condiciones de crecimiento e incrementar la extracción de madera de buena calidad. Los pinos son cultivados con 3-4 m de separación entre cada pie, y se dejan crecer hasta los 25 años, alcanzando alturas de entre 28-30 m y un diámetro de unos 30 cm, que es cuando se recolectan. Los pinos que se dejan crecer hasta los 50 años pueden llegar a los 35 m de altura, 50 cm de diámetro y su madera puede llegar a valer hasta 7 veces más que la de un pino de

Introducción.

25 años (Roth, 2016; NZ Farm Forestry, 2020; NZ Farm Forestry, 2020; Bruce, 2020).

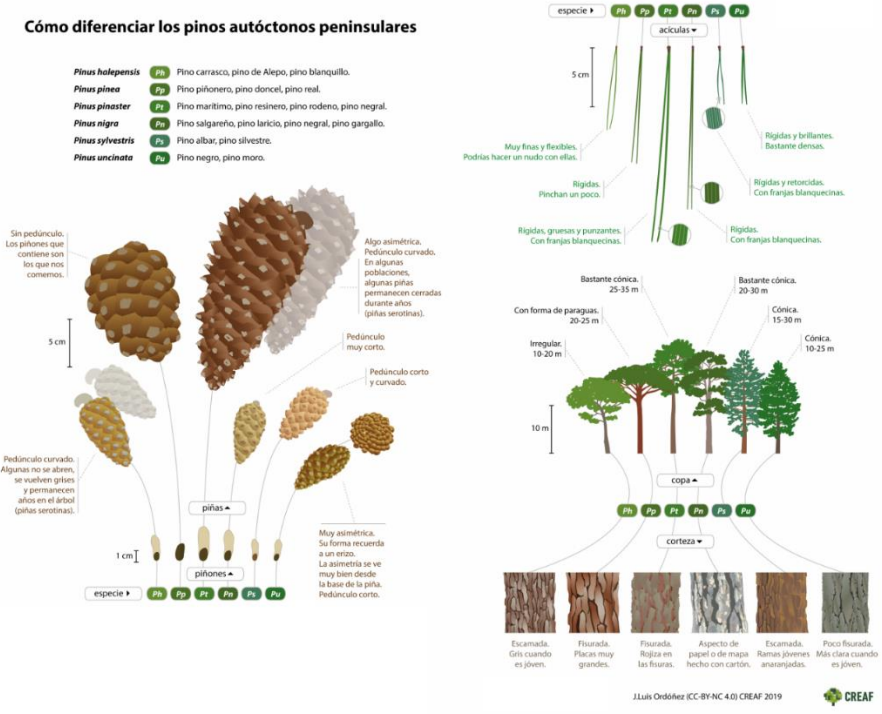


Figura I7. Descripción de los principales rasgos morfológicos para la identificación de las especies de pino más representativas de la península ibérica. Fuente: www.creal.cat

Dado que las especies de pino poseen un ciclo de vida muy largo, alcanzando la madurez a los 12-15 años, la selección, siembra y explotación de variedades élite de forma natural es un proceso bastante lento. Sin embargo, con nuevas técnicas de cultivo *in vitro* como la embriogénesis somática, se abren nuevas posibilidades para el rescate, diseño y explotación de cultivares de alto rendimiento. Es por ello por lo que cada vez más trabajos se centran en el estudio de los mecanismos

Introducción.

moleculares que permiten el cultivo de ejemplares de pino *in vitro*, el aumento del rendimiento o la mejora de la calidad (Lelu-Walter et al., 2006; Llebrés et al., 2018).

Pero no sólo es importante el desarrollo en etapas tempranas, ya que es la disponibilidad de nutrientes lo que va a determinar el mejor desarrollo de los árboles en sí, y con ello el rendimiento económico que de la calidad de sus productos se derive. Por ello se están haciendo también estudios relacionados con la captación de nutrientes del suelo, aire y agua, y las posibles repercusiones que pudieran tener las consecuencias del cambio climático sobre los cultivos de estos pinos, como pueda ser el aumento de la presión parcial de CO₂, variaciones altas de temperatura o largos periodos de sequía.

Como se ha dicho anteriormente, uno de los principales nutrientes determinantes del crecimiento de las plantas es el nitrógeno. Su disponibilidad determinará el buen desarrollo de los pinos y en consecuencia una producción maderera de calidad. Estudios recientes ahondan en la preferencia de los pinos por diferentes formas de nitrógeno, y sus consecuencias en la expresión génica (Ortigosa et al., 2021). Conocer más a fondo los mecanismos de gestión del nitrógeno incorporado permitirá diseñar soluciones de abonado más eficientes en cuanto a captación se refiere, pues como se ha comentado anteriormente, el cultivo intensivo ha de alcanzar un equilibrio entre impacto ambiental y producción.

Uno de los elementos centrales en el metabolismo del nitrógeno en los pinos es la arginina, pues actúa como almacén de nitrógeno, como se ha

Introducción.

comentado anteriormente. Además de esta función de reserva en semillas, también se ha observado que aumenta su síntesis cuando las plantas reciben un aporte alto de amonio. Este amonio se acumula transitoriamente en arginina, para que la planta pueda captar todo el que haya disponible en ese momento en el suelo, y posteriormente esta arginina se va degradando, para de nuevo distribuir el nitrógeno por toda la planta (Llácer et al., 2008).

La síntesis de arginina comienza con glutamato y acetyl-CoA en el cloroplasto. La enzima N-acetilglutamato sintasa (NAGS, EC 2.3.1.1) une un grupo acetilo al glutamato, dando lugar a N-acetilglutamato, el cual es sustrato de la enzima N-acetilglutamato quinasa (NAGK, EC 2.7.2.8) y genera fosfo-N-acetilglutamato. Posteriormente, la enzima fosfo-N-acetilglutamato reductasa (NAGPR, EC 1.2.1.38) transforma el fosfo-N-acetilglutamato en N-acetilglutamato 5-semialdehído, el cual será transformado en N-acetilornitina mediante la actividad de la N-acetilornitina-aminotransferasa (NAOAT, EC 2.6.1.11), enzima a la que se le atribuye un papel defensivo ante la infección por *Pseudomonas syringae* (Lee et al., 2008). Con la síntesis de N-acetilornitina concluiría la primera parte de la ruta, también denominada “parte cíclica”, por la capacidad de transformar esta N-acetilornitina en N-acetilglutamato, el primer producto de la ruta.

Esta N-acetil-ornitina libre tiene dos destinos, según la planta en cuestión: puede salir del cloroplasto a través de transportadores de aminoácidos básicos (BACs) hacia el citoplasma, donde es sustrato de la enzima N-acetilornitina deacetilasa (NAOD, EC 3.5.1.16) y libera

Introducción.

ornitina, la cual es sustrato de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC) que genera putrescina, la primera poliamina. O bien, puede continuar la ruta de síntesis de arginina, mediante la transferencia del grupo acetilo a una molécula de glutamato y liberando ornitina, reacción catalizada por la enzima N-acetilornitina-glutamato-acetil transferasa (NAOGAcT, EC 2.3.1.35), paso que regenera el N-acetilglutamato comentado anteriormente. El primer destino dependerá de si existe esta enzima en el organismo en cuestión, pues la gran mayoría de plantas cuentan con ella, aunque hay algunos casos particulares en los que no aparece, como se ha comentado con anterioridad.

Con la ornitina producida por la enzima NAOGAcT daría comienzo la segunda parte de la ruta de biosíntesis de arginina, denominada también como ruta lineal, en contraposición a la denominada “ruta cíclica” antes descrita, pues no se regenera ninguno de los componentes al final de la ruta. La ornitina es sustrato de la enzima ornitina transcarbamoylase (OTC, EC 2.1.3.3) y junto a una molécula de carbamoyl fosfato, genera citrulina y una molécula de fosfato inorgánico (Pi). La citrulina es ahora convertida en argininosuccinato, reacción que cataliza la enzima argininosuccinato sintetasa (ASSY, EC 6.3.4.5) y que requiere de una molécula de aspartato, otra de ATP e iones magnesio (Mg^{2+}), liberándose después de la reacción tanto argininosuccinato, como adenosina monofosfato (AMP) y pirofosfato (PPi). Por último, la enzima argininosuccinato liasa (ASL, EC 4.3.2.1) rompe la molécula de argininosuccinato, liberando una molécula de fumarato y una molécula de arginina.

Introducción.

Como se ha dicho antes, la ornitina tiene dos posibles destinos, dependiendo de la presencia de la enzima ODC en el organismo en cuestión. El flujo de nitrógeno hacia la síntesis de arginina o de putrescina dependerá tanto de la afinidad que tenga el transportador de aminoácidos básicos por la N-acetil-ornitina como de la capacidad del resto de enzimas de la ruta para consumir N-acetil-ornitina (NAOGAcT, OTC, ASSY y ASL).

La proteína PII (Hsieh et al., 1998; Selim et al., 2020; Llebrés et al., 2020) es la encargada de regular el proceso de incorporación de nitrógeno en forma de arginina, pues se regula tanto por 2-oxoglutarato (2-OG), ATP, ADP y modificaciones postraduccionales. De esta forma, cuando hay poco amonio disponible, el ciclo GS-GOGAT no usa 2-OG, con lo cual hay suficiente disponible para bloquear la proteína PII, impidiendo que interactúe con la enzima NAGK, la cual, al ser sensible a la inhibición por arginina, puede bloquear su actividad cuando hay exceso de síntesis de arginina, con lo cual no se captaría todo el amonio disponible. Cuando hay aporte de amonio, se activa el ciclo GS-GOGAT, se consume 2-OG y no se bloquea la proteína PII, que puede, ahora sí, interactuar con la enzima NAGK, impidiendo que se inhiba por arginina, y permitiendo la síntesis de arginina, que bien puede acumularse en la vacuola en forma libre, o acumularse en proteínas de reserva, evitando así un posible efecto osmótico de la arginina libre.

Analizando las reacciones de los últimos pasos de la ruta, se puede observar que tanto la OTC como la ASSY están implicadas en catalizar reacciones que, *a priori*, podrían ser de un único sentido, pues la OTC

Introducción.

libera un grupo Pi tras la reacción, y la ASSY libera P₂i, moléculas altamente reactivas en la célula y que suelen ser costosas energéticamente de revertir. Por lo tanto, podrían ser estas enzimas las determinantes en el final de la ruta, pues dirigirían el flujo de N-acetilornitina hacia la síntesis de arginina a través de reacciones de un solo sentido. Esta es la premisa desde la que parte el desarrollo de esta tesis doctoral, con el objetivo de conocer los mecanismos y constantes enzimáticas de estas enzimas, principalmente OTC y ASSY, para comprender qué papel juegan en la ruta y si existe algún mecanismo de regulación sobre estas enzimas.

Para ello, se realizará el estudio de estas enzimas en organismos que poseen ODC y ADC, como son *Pinus pinaster* y *Marchantia polymorpha*, y en otros que sólo poseen ADC, como *Arabidopsis thaliana* y *Physcomitrium patens*. Con la particularidad de que estos organismos, además de tener o no ODC, poseen o carecen de semilla, otra de las características que hacía relevante el estudio de esta ruta, pues en ellas se acumulan grandes cantidades de proteínas de reserva ricas en arginina

Introducción.

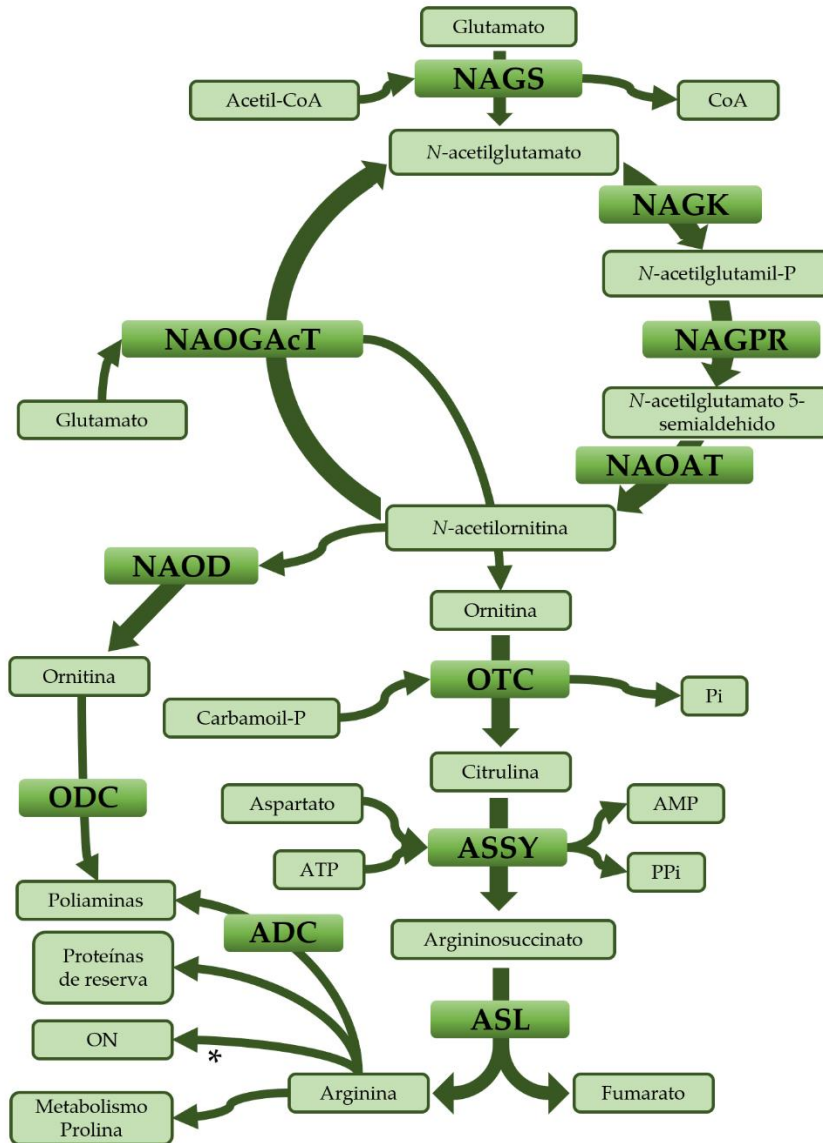


Figura I8. Ruta de biosíntesis de arginina desde glutamato, con los posibles destinos de la propia arginina, donde se pueden ver las dos partes de la ruta: Glutamato → Ornitina, Ornitina → Arginina. Modificado de Urbano-Gamez et al. (2020). * Aún no están claros los mecanismos que dan lugar a ON desde arginina.

Introducción.

Organismo	ODC	ADC	Semilla
<i>Pinus pinaster</i>	Sí	Sí	Sí
<i>Arabidopsis thaliana</i>	No	Sí	Sí
<i>Marchantia polymorpha</i>	Sí	Sí	No
<i>Physcomitrium patens</i>	No	Sí	No

Tabla II. Especies seleccionadas para su estudio.

Arabidopsis thaliana es quizás el organismo vegetal más ampliamente estudiado a nivel molecular en todo el mundo. Pertenece a la familia de las brassicáceas y es una planta de corto ciclo de vida, pues tarda sólo unas 6 semanas desde que germina hasta que produce semillas maduras. De porte pequeño (20-30 cm de altura), permite su cultivo extensivo en pequeñas instalaciones. A pesar de no tener relevancia agronómica, su pequeño genoma (125 Mb), su capacidad de autofecundarse, su prolífica producción de semillas y su facilidad para ser transformada genéticamente (www.arabidopsis.org) le ha valido un puesto de primera línea en la investigación de las plantas, y se han desarrollados multitud de herramientas, líneas mutantes, bases de datos y comunidades científicas enfocadas principalmente al estudio de este vegetal y a la obtención de conocimiento que pueda trasladarse a otras plantas de interés agronómico, pero más complejas de estudiar. A pesar de tener su genoma secuenciado por completo desde el año 2000, y ser objeto de innumerables estudios, aún existen unas 1200 proteínas de las que se desconoce su función (www.arabidopsis.org/news, visitado 10-Nov-2021), lo que da una idea de la complejidad del estudio de los organismos, incluso siendo tan sencillos genéticamente. Además de no poseer ODC, *Arabidopsis* forma una semilla, que, aunque contiene

Introducción.

proteínas de reserva, principalmente globulinas (Baud et al., 2002), no son tan abundantes como en la semilla de pino.



Figura I9. Ejemplar de *Arabidopsis thaliana* en diferentes fases de desarrollo.
Fuente: editado de www.ecured.cu

Marchantia polymorpha es un organismo vegetal perteneciente al grupo de las hepáticas. Es un organismo dioico distribuido por todo el mundo, excepto en los polos (Shimamura, 2016). Presenta un genoma de pequeño tamaño, 280 Mb aproximadamente, y junto con su condición haploide y su facilidad para transformarse genéticamente, han hecho de esta planta un nuevo organismo modelo, principalmente para el estudio de fenómenos evolutivos en plantas y sistemas de defensa (Giménez-

Introducción.

Ibáñez et al., 2019; Poveda, 2020). Este organismo presenta tanto ODC como ADC, y aunque no posee semilla, y por ello carece de las proteínas de reserva típicas de gimnospermas y angiospermas, sí que probablemente presenten un tipo de proteína de reserva en la espora, procedente de un procariota ancestral y de la cual se derivarían las actuales proteínas de reserva (Templeman et al., 1988), ya que no tendría un papel tanto de reserva como agente osmótico contra la desecación, pues los briófitos son las primeras especies vegetales que desarrollan mecanismos para colonizar el medio terrestre.



Figura I10. Ejemplar de *M. polymorpha* en el cual se puede observar el talo fotosintético con estructuras de copa de gemas usadas para la reproducción asexual. Fuente: www.Sci-News.com

Physcomitrium patens (anteriormente denominado *Physcomitrella patens*) es otro de los organismos perteneciente al grupo de los briófitos, pero distinto de las especies del género *Marchantia*, y se encuentra distribuido principalmente en el hemisferio norte, aunque otras especies del género están distribuidas por otras partes del globo. Con un genoma secuenciado de unas 500 Mb, una característica relevante de este organismo es la alta eficiencia que tienen las recombinaciones homólogas, permitiendo el estudio de regiones concretas de su

Introducción.

secuencia. Esta facilidad, junto con compartir procesos con las plantas vasculares, es lo que lo hace ser un organismo modelo, principalmente para estudios de desarrollo evolutivo (Rensing et al., 2020), pero también para producción industrial (Reski et al., 2018). A diferencia de *Marchantia*, este organismo no presenta ODC, e igual que *Marchantia*, es un organismo productor de esporas, y probablemente podría contener también algún tipo de proteínas de reserva similares.



Figura I11. Ejemplar de *P. patens* en el que se observa el talo fotosintético.
Fuente: www.nibb.ac.jp

Objetivos

1. Identificar las secuencias de nucleótidos correspondientes a las enzimas OTC, ASSY y ASL en los organismos *Pinus pinaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens*.
2. Comparar las secuencias primarias de las enzimas para determinar posibles dominios diferenciales entre plantas y animales.
3. Comparar las estructuras tridimensionales de las enzimas en plantas y determinar su conservación evolutiva.
4. Determinar los parámetros cinéticos de las enzimas OTC, ASSY y ASL en los organismos *Pinus pinaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens*.
5. Determinar la esencialidad de las enzimas de la ruta estudiando la viabilidad de individuos mutantes para estas enzimas en *Arabidopsis thaliana*.

Material y métodos.

1. Búsqueda de secuencias y análisis.

Se realizó una primera búsqueda de las secuencias de los CDS correspondientes a las proteínas OTC, ASSY y ASL de *Arabidopsis thaliana* en la base de datos TAIR (www.arabidopsis.org). Dichas proteínas corresponden a los códigos At1g75330 para la OTC, At4g24830 para la ASSY y At5g10920 para la ASL. A partir de estas secuencias, se realizó una búsqueda más amplia de secuencias homólogas para los mismos genes en diferentes organismos, principalmente en las bases de secuencias Onekp (<https://db.cngb.org/onekp/>) y Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), además de otras bases de secuencias específicas como Congenie (<https://congenie.org/>).

Las secuencias fueron analizadas y se les eliminó la región correspondiente al péptido de tránsito al cloroplasto (ptc) para evitar sesgo en el análisis de las secuencias. Posteriormente se alinearon usando el software Clustal X2.

Material y métodos

2. Extracción de RNA total y obtención de cDNA.

Semillas de pino (Sierra de Segura, Jaén) fueron sumergidas en agua con aireación durante 24 h para inducir la germinación. Posteriormente fueron depositadas entre dos lechos de vermiculita (Vermiculita N^o3, Projar S.A.), regadas únicamente con agua destilada y en ciclo día/noche 16/8 h a una temperatura de 25 °C hasta que los cotiledones quedaron completamente extendidos. Los cotiledones de las plántulas fueron recolectadas y congeladas de inmediato en nitrógeno líquido. Se pulverizó el material vegetal y se alicuotó en tubos con 100 mg de tejido. Se extrajo el RNA siguiendo el procedimiento de precipitación CTAB-LiCl (Chang, 1993). A partir del RNA obtenido se procedió a la síntesis de cDNA usando un kit de retrotranscripción de RNA iScript™ cDNA Synthesis Kit (#1708890, BioRad).

En el caso de *Arabidopsis*, semillas de la línea Columbia-0 fueron vernalizadas durante 48 h a 4 °C en agua destilada, y posteriormente se germinaron en un sustrato formado por una mezcla de tierra esterilizada y vermiculita, en relación 3:1, bajo condiciones de 25 °C, 70% humedad y con ciclo día/noche 16/8 h. Una vez germinadas, hojas de roseta fueron recogidas y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. El tejido fue pulverizado y alicuotado en tubos con 100 mg de tejido para extraer RNA. Se usó el mismo protocolo para extraer RNA y kit para sintetizar cDNA que en el caso anterior de los cotiledones de pino.

Material y métodos.

De igual forma se procedió para extraer el RNA de *Physcomitrium patens*, a partir de plantas de genotipo silvestre (WT) de la línea GD II, cedidas por el profesor Jesús Vicente Carbajosa (Universidad Politécnica de Madrid) y subcultivadas en placa en medio BCDAT en fitotrones (HederaHelix HH70P), con ciclo día/noche 16/8 h a 25 °C.

El cDNA de *Marchantia polymorpha* fue cedido por Isabel Monte, perteneciente al grupo del investigador Roberto Solano (Centro Nacional de Biotecnología, Madrid).

3. Clonación de genes OTC, ASSY, ASL.

A partir de las librerías de cDNA generadas, se clonaron los CDS correspondientes a los genes codificantes para OTC, ASSY y ASL de los cuatro organismos, usando cebadores específicos. Los CDS correspondientes a las proteínas ASSY y ASL de *P. patens* no pudieron ser clonados.

Una vez clonados, se insertaron en el vector pJET-1.2 (ThermoFisher), para secuenciar y comprobar así que el CDS clonado era el correcto. En los casos particulares de los CDS de las enzimas OTC#2745, ASSY#4480 y #33150 y ASL de *P. patens* no fue posible clonar los CDS desde cDNA y no se pudieron obtener las proteínas recombinantes.

Material y métodos

Organismo	Gen	Cebador FW	Cebador FW sin ptc (*)	Cebador RV
<i>Pinus pinaster</i>	<i>Ppotc</i>	ATGGAAATGGCGGCGTTGCC	ATAAGATGCCAAAGCTCTGCCGC	TCAAAGTCCAAGAGCATGCA
	<i>Ppassy</i>	ATGGCGCATTTGTCGGCA	GGAATACGTGGAAAATTGAA	TCATAGTCCACTTTGTAGCA
	<i>Ppasl</i>	ATGGAAACAATAGTCACGC	GAAGTGAAGCTGTGGGAGG	TCAAGCATTTCTGATTTGTT
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Atotc</i>	ATGGCGGCTGCAATGGCTTCTC	GTTTCATGTCAAGCCTCCTC	AAAGCCGAGCAAGTGAAGCAT
	<i>Atassy</i>	ATGGCTGAAATCTCGGCGAC	GCTGTTCTATCCGGTGATGG	CTAGCTAATTTTCTTAAGCA
	<i>Atasl</i>	ATGGGAGCAATTGATCTCTC	TCAATGAGTCATGACGACGA	TCAGGTGGAAGTAATGTTGA
<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Mpotc</i>	ATGGGGGTCGTTGCTGCTGC	TGCAAAAGCTCTACTGCGAC	TTAAGTCCAAGAACGTGTA
	<i>Mpassy</i>	ATGATTGCCGCTGCTTCGAA	GCCGGAGCGAAGTCTGAGGG	CTACTGCTGTGCCTTCCTCT
	<i>Mpasl</i>	ATGATGCTGGGAGCCGGGAC	GCTGCTGCTGCGGAAGAAGG	TTAATTCCTTTTCAGATC
<i>Physcomitrium patens</i>	<i>Ppatotc_1</i> (#2745)	ATGGCCCTCCAGTTGAGTGG	AGGACTGATATTTTCAGTGC	TCAGAAACCGAGACAGTGA
	<i>Ppatotc_2</i> (#7070)	ATGGTCATGGCTCTGCGGTT	AGGACTGATATTTTCAGTGC	TCAAAAACCAAGACAGTGA
	<i>Ppatassy_1</i> (#4480)	ATGTCACCAACATCTTGAC	GCTCAACGCAAAGTTTCTCA	CTAAAGACCGCTGTTTTGCA
	<i>Ppatassy_2</i> (#33150)	ATGGCGGCAACAATGGCGTG	GCTCAACGCAAAGTTTCTCA	TTAAAGACCGTTGTTTTGCA
	<i>Ppatasl</i>	ATGCAGCAGTTAAATCTTCT	GAGGCTAAGTTATGGGGAGG	TCACATCCCAAGTTTGCTGA

Tabla M1. Cebadores usados para clonar los CDS desde las librerías de cDNA generadas. Los números después de # indican el código de acceso en Phytozome. (*) ptc: péptido de tránsito al cloroplasto.

4. Producción de las enzimas recombinantes.

Con el objetivo de subclonar los diferentes CDS en el vector de expresión heteróloga en *E. coli* pDEST17, se añadieron regiones attB por PCR en los extremos de los fragmentos clonados mediante cebadores híbridos primero (Tabla M2), y con los attB completos después (attB1: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT para la región FW del CDS; attB2: GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT para la región RV del CDS), para hacerlos así compatibles con el sistema Gateway® (ThermoFisher). Los cebadores híbridos contienen en su secuencia una región complementaria con el CDS de la proteína objetivo y otra región complementaria con los cebadores attB. Mediante la recombinasa BP de este sistema, los CDS clonados se pueden insertar en un vector “donador” como el pDONR-207, usado en todos los casos.

Material y métodos

Organismo	Gen	Cebador attB/CDS_FW sin ptc	Cebador attB/CDS_RV
<i>Pinus pinaster</i>	<i>Ppotc</i>	AAAAAGCAGGCTTGATAAGATGCCAAAAGCTCTGCCGC	AGAAAGCTGGGTTCAAAGTCCAAGAGCATGCA
	<i>Ppassy</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTGGAATACGTGGAATAATTG	GTACAAGAAAGCTGGGTTTCAATAGTCCACTTTGTAG
	<i>Ppasl</i>	AAAAAGCAGGCTTGGAAGTGAAGCTGTGG	AGAAAGCTGGGTTCAAGCATTTCCTGA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Atotc</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTGTTTCATGTCAAGCCTCCTC	ACCCAGCTTTCTTGTACTTAAAAGCCGAGCAAGTGAAGC
	<i>Atassy</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTTGGCTGTCTATCCGG	GTACAAGAAAGCTGGGTTCTAGCTAATTTTC
	<i>Atasl</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTTGCAATGAGTCATG	GTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAGTGAAGTA
<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Mpotc</i>	AAAAAGCAGGCTTGCAAAAAGCTCTAC	AGAAAGCTGGGTTTAAAGCTCCAAGAAC
	<i>Mpassy</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTTGGCCGGAGCGAAGT	GTACAAGAAAGCTGGGTTTACTGCTGTGCCT
	<i>Mpasl</i>	TACAAAAAAGCAGGCTTGGCTGCTGCTGCGG	AAGAAAGCTGGGTTTAAATCTTCTTT
<i>Physcomitrium patens</i>	<i>Ppatotc_1</i> (#2745)	GTACAAAAAAGCAGGCTTGAGGACTGATATTTT	GTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAGAACCGAGAC
	<i>Ppatotc_2</i> (#7070)	GTACAAAAAAGCAGGCTTGAGGACTGATATTTT	GTACAAGAAAGCTGGGTTTCAAAAACCAAGAC
	<i>Ppatassy_1</i> (#4480)	GTACAAAAAAGCAGGCTTGGCTCAACGCAAAG	GTACAAGAAAGCTGGGTTTAAAGACCGCTG
	<i>Ppatassy_2</i> (#33150)	GTACAAAAAAGCAGGCTTGGCTCAACGCAAAG	GTACAAGAAAGCTGGGTTTAAAGACCGTTG
	<i>Ppatasl</i>	GTACAAAAAAGCAGGCTTGGAGGCTAAGT	GTACAAGAAAGCTGGGTTTCAATCCCAAGTTT

Tabla M2. Cebadores híbridos (attB/CDS) usados para generar los extremos attB en los CDS clonados y hacerlos así compatibles con el sistema Gateway® para producir las proteínas recombinantes.

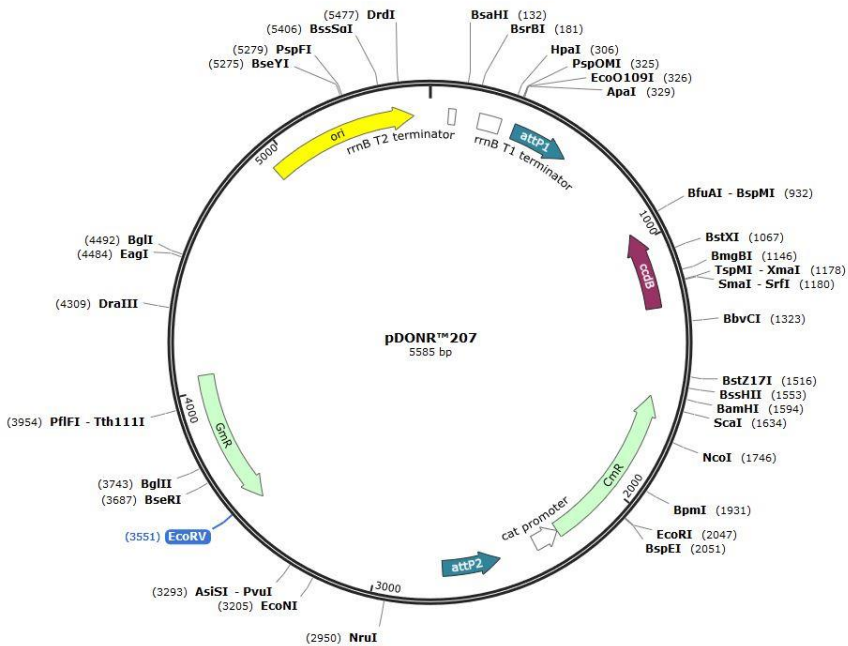


Figura M1. Mapa del vector “donador” pDONR™-207 usado en el sistema Gateway® como vector intermedio. Fuente: Addgene (www.addgene.org).

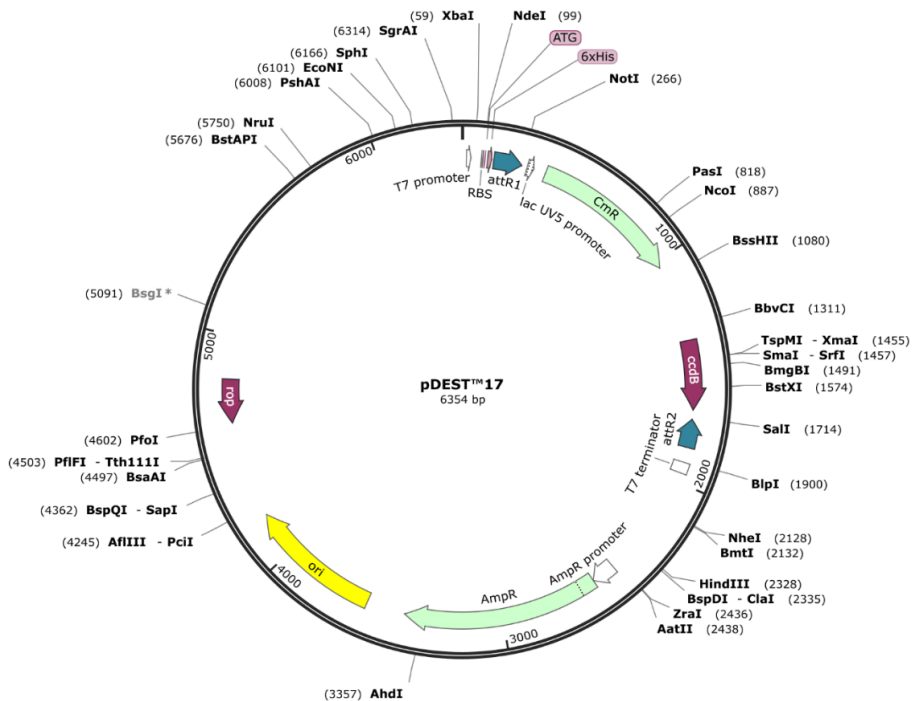


Figura M2. Mapa del vector de destino pDEST™-17 usado en el sistema Gateway® como vector final para producir las proteínas recombinantes. Fuente: Addgene (www.addgene.org).

Material y métodos

Desde el vector “donador” se puede transferir el CDS a diferentes vectores “destino”, mediante la recombinasa LR del sistema Gateway®, los cuales poseen diferentes elementos en su secuencia, en función de las necesidades del investigador. En todos los casos se ha usado el vector pDEST17, el cual facilita la producción recombinante de las proteínas objetivo en grandes cantidades, además de añadir una región de polihistidinas (6 histidinas seguidas en el extremo N-terminal) para facilitar su posterior purificación.

Una vez en el vector pDEST17, las construcciones fueron secuenciadas por el método de “Sanger” para confirmar la correcta inserción del CDS en el plásmido, en el servicio de secuenciación de la empresa Stabvida (www.stabvida.com)

Para la producción en grandes cantidades de las proteínas recombinantes, se transformaron diferentes cepas de *Escherichia coli* con los vectores de expresión conteniendo los CDS de interés. La producción de proteínas recombinantes se probó con diferentes cepas y a diferentes condiciones de temperaturas y periodos de incubación hasta obtener las condiciones óptimas de producción tal y como se ilustra en la tabla M3.

Las bacterias transformadas se crecieron a 37 °C junto con los antibióticos y, en el caso de la cepa Lemo21® (DE3), (New England Biolabs), en presencia de ramnosa, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 ($OD_{600} = 0.5$) en alta agitación (120-150rpm). Posteriormente fueron inducidas añadiendo IPTG a una concentración final de 0.4 mM para todos los cultivos de Lemo21® y 0.5 mM para los cultivos de RIL (BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, Agilent). En el caso particular de la

Material y métodos.

enzima ASL de *Pinus pinaster*, no fue necesaria la inducción, pues la proteína se producía mientras crecía el cultivo y resultó ser la forma más productiva de las diferentes condiciones probadas para esta enzima.

Los cultivos se mantuvieron en agitación suave durante el tiempo de incubación óptimo para cada proteína y posteriormente se centrifugaron a 5000 x g para recoger las bacterias en un pellet, que inmediatamente fue congelado a -80 °C. Los pellets fueron sometidos a ruptura por sonicación (10 s 30% + 5 s STOP durante 3 min; Sonifier SFX 150 digital; BRANSON) en un buffer de lisis junto con lisozima (#L6876, Sigma-Aldrich) 1 mg/mL, para liberar la proteína recombinante producida en las bacterias. Tras la ruptura, se centrifugó en frío (4 °C) a 10000 x g durante 10 min para separar los restos celulares y compuestos insolubles de las proteínas recombinantes solubles contenidas en el sobrenadante.

El sobrenadante fue seguidamente filtrado (0.22 µm PVDF, Whatman) y las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad mediante la cola de histidinas introducidas en el extremo amino terminal. Dicha cola de histidinas permite la unión al níquel que contiene la resina de la columna de cromatografía (kit de purificación Protino™ NiTED HisTag; Macherey-Nagel®). Posteriormente la columna es lavada y se eluyen y recogen las proteínas purificadas. En cada paso de la purificación, se extrajo una alícuota y se analizó por SDS-PAGE para seguir el proceso de la purificación y conocer qué fracción de la elución contenía la proteína recombinante.

Material y métodos

Proteína	Cepa	Temperatura (°C)	Inducción	Tiempo	Rpm	Medio de cultivo + aditivos
PpOTC	LEMO	30	0.4 mM IPTG	8h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol + 0.4 mM ramnosa
AtOTC	LEMO	30	0.4 mM IPTG	8h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol + 0.4 mM ramnosa
MpOTC	LEMO	30	0.4 mM IPTG	8h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol + 0.4 mM ramnosa
PpatOTC	LEMO	30	0.4 mM IPTG	8h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol + 0.4 mM ramnosa
PpASSY	RIL	25	0.5 mM IPTG	5h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol
AtASSY	RIL	25	0.5 mM IPTG	5h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol
MpASSY	RIL	25	0.5 mM IPTG	5h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol
PpASL	RIL	37	No inducido	5h	100-120	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol
AtASL	RIL	25	0.5 mM IPTG	5h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol
MpASL	RIL	25	0.5 mM IPTG	5h	60-75	LB + 100 µg mL ⁻¹ ampicilina + 25 µg mL ⁻¹ cloranfenicol

Tabla M3. Condiciones de producción de las proteínas recombinantes. LEMO corresponde a la cepa comercial BL21 Codon Plus DE3 Lemo System™, New England BioLabs® y RIL a la cepa comercial BL21 Codon Plus DE3 RIL™, New England BioLabs®. El medio LB corresponde al medio Luria-Bertani para el cultivo de bacterias. Pp = *Pinus pinaster*, At = *Arabidopsis thaliana*, Mp = *Marchantia polymorpha*, Ppa = *Physcomitrum patens*.

Material y métodos.

Las alícuotas con mayor cantidad de proteína purificada, medido mediante método de Bradford (Protein Assay Dye Reagent Concentrate, BioRad), fueron cargadas en una columna de cromatografía de exclusión de tamaño (resina Sephadex G-25 en columnas PD-10, GE Healthcare), para separar las enzimas recombinantes de las pequeñas moléculas e iones que pueden interferir en los ensayos enzimáticos, así como para modificar además la composición de la solución tamponadora.

La concentración de proteína se determinó por western blot, tomando como referencia cantidades conocidas de una proteína recombinante con HisTag. Los anticuerpos usados fueron anti-His 6 (Roche Life Science) y anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Santa Cruz Biotechnology) a diluciones 1:5000 y 1:10000 respectivamente. El análisis por SDS-PAGE así como western blot fueron llevados a cabo como ya fue descrito previamente (Cantón, 1996).

5. Medida de actividad OTC, ASSY y ASL.

a. Medidas de actividad OTC.

La OTC cataliza la reacción:



La actividad enzimática de las 4 OTCs fue determinada mediante la cuantificación colorimétrica del fosfato (Pi) liberado durante la reacción, siguiendo el protocolo descrito por Bernhart (1955) con algunas

Material y métodos

modificaciones. La mezcla de reacción en un volumen total de 100 μL Tris-HCl 50 mM, 1 mM L-ornitina y 5 mM carbamoil-P junto con la enzima OTC purificada y desalada, se incubó a 25 °C en un rango de tiempos entre 1 y 5 min. La reacción se detiene añadiendo 800 μL de una solución de molibdato, la misma mezcla que permite la medida colorimétrica, compuesta por acetona 50% (v/v), 5 N H_2SO_4 y molibdato amónico 5% (p/v) en proporción 2:1:1 y que deben ser añadidos en ese orden y agitado para preparar la mezcla, pues de lo contrario distorsiona los resultados. La absorbancia fue medida a 430 nm 12 s después de detener la reacción, en el espectrofotómetro UV-1611, Shimadzu®. Las concentraciones usadas para determinar los parámetros cinéticos estaban en el rango de 0 mM hasta 4 mM para la ornitina y de 0 mM hasta 30 mM para el carbamoil-P. El contenido en Pi fue calculado a partir de una recta patrón usando fosfato sódico comercial (Merck).

b. Medida de actividad ASSY

La enzima ASSY cataliza la reacción:



La actividad de las enzimas ASSY de los organismos se determinó a través de la medida del PPi liberado durante la reacción. El PPi reacciona con molibdato dando lugar a 18-molibdopirofosfato. Este compuesto genera un color azul al reducirse en presencia de ácido ascórbico, con un máximo de absorbancia a 790 nm, como se describió en el artículo de Katano (2012). La reacción se lleva a cabo en un

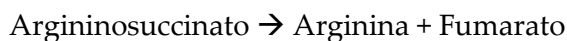
Material y métodos.

volumen total de 100 μL , conteniendo Tris-HCl 50 mM pH 8, 2 mM citrulina, 2 mM aspartato, 3 mM adenosina trifosfato (ATP), 10 mM MgCl_2 y la enzima ASSY purificada.

La reacción se incubó a 25 °C en un rango de 1 a 8 min. Cada minuto se extrajeron alícuotas de 10 μL y la reacción enzimática fue detenida con 10 μL de una solución EDTA-NaOH, conteniendo 400 mM EDTA y 1.4 M NaOH. A estos 20 μL se añaden 200 μL de una solución de molibdato compuesta por acetonitrilo 60% (v/v), 12 N HCl 5% (v/v) y 20 mM molibdato sódico y se deja incubar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente se añade 80 μL de una solución que contiene acetonitrilo 60% (v/v), 12 N HCl 5% (v/v) y 500 mM ácido ascórbico (#A5960-100G, Sigma-Aldrich) hasta un volumen final de 300 μL , se deja incubar 10 min temperatura ambiente y en oscuridad y se mide la absorbancia a 790 nm en el lector de microplacas PowerWave HT, BioTek®. El rango de concentraciones usado tanto para citrulina como para aspartato va desde 0 mM hasta 2 mM. El contenido en PPi se calculó a partir de una recta patrón con pirofosfato de sodio comercial (Merck, Alemania).

c. Medida de actividad ASL

La enzima ASL cataliza la reacción:



Material y métodos

La actividad de la enzima ASL se determinó midiendo la absorbancia del fumarato liberado a 240 nm. La mezcla de reacción contenía 50 mM Tris-HCl, 2 mM argininosuccinato y la enzima ASL purificada. La reacción se incubó a 25 °C durante 8 min, tomando medidas cada 30 s, con agitación previa. Las concentraciones usadas de argininosuccinato están en el rango entre 0 mM y 2 mM. Las cantidades de fumarato fueron calculadas a partir de una recta patrón con ácido fumárico comercial (Merck, Alemania).

Para todas las cinéticas enzimáticas se usó el software PRISM5 para el cálculo de los valores de K_m , $S_{0.5}$, $V_{m\acute{a}x}$ e índice de Hill (nH) aparentes (para OTC “nonlinear analysis → allosteric sigmoidal” y para ASSY y ASL “nonlinear analysis → Michaelis-Menten”) (GraphPad Software LLC).

6. Cromatografía de exclusión.

Alícuotas purificadas de las proteínas recombinantes desaladas de PpOTC, PpASSY y PpASL fueron cargadas de forma separada en una columna de exclusión de tamaño ENrich™ SEC 650 (BioRad) para determinar el tamaño del multímero a pH 8. La columna fue calibrada usando un conjunto de proteínas recombinantes comerciales estandarizadas (Gel Filtration Markers Kit MWGF1000, Sigma-Aldrich, MO, EEUU): tiroglobulina (669 kDa), apoferritina (443 kDa), β-amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa). Las fracciones de las proteínas recombinantes fueron recogidas y la elución de las holoenzimas se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y posteriormente se confirmó mediante western blot.

7. Líneas mutantes de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de plantas procedentes de líneas de *A. thaliana* mutantes para los genes *Atotc*, *Atassy* y *Atasl* fueron obtenidas del Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC por sus siglas en inglés). La variedad de líneas mutantes está recogida en el servicio web SIGnAL T-DNA, perteneciente al Salk Institute of Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>), donde se pueden conocer las líneas mutantes existentes para los genes de *Arabidopsis* y saber la localización de la inserción. Las líneas escogidas atendían a la disponibilidad de semillas, la localización de la inserción en el gen y a la confirmación de la inserción. De esta forma, se seleccionaron las siguientes líneas: GABI-Kat_268C05 y SALK_099780 para *Atotc*, SALK_145430 para *Atassy* y GABI-Kat_149C10 y SK_439 para *Atasl*.

Las semillas fueron vernalizadas durante 48 h a 4 °C en agua destilada, y posteriormente se sembraron en una mezcla de sustrato fértil esterilizado y vermiculita (3:1) para germinar. Las condiciones de cultivo fueron 25 °C, 70% humedad, ventilación continua y con ciclo día/noche 16/8 h. La línea wt utilizada fue Col-0, disponible en el laboratorio. Una vez germinadas, se tomó una hoja de roseta para extraer el material genómico, siguiendo el protocolo de Edwards (1991) con las modificaciones del laboratorio de Charles Gasser.

Para determinar la presencia o no de la mutación, se realizaron reacciones de PCR sobre el material genómico extraído con los cebadores específicos para cada gen y línea, recogidos en la tabla M4. En función de la combinación de cebadores usados, y de los productos

Material y métodos

de PCR amplificados, se puede determinar si el individuo del que procede el material genético es silvestre (WT), heterocigoto para la mutación u homocigoto para la mutación.

Los productos de PCR fueron cargados en un gel de agarosa al 1% (p/v) junto con RedSafe™ (20000x) (iNtRON® Biotechnology) al 0.004% (v/v), sometidos a una electroforesis (30 min a 100 V) y revelados en el sistema ChemiDoc XRS+ (Bio Rad) para visualizar y determinar los tamaños de los productos, junto con un marcador de peso molecular comercial (GeneRuler 1 kb plus DNA ladder, Thermo Fisher).

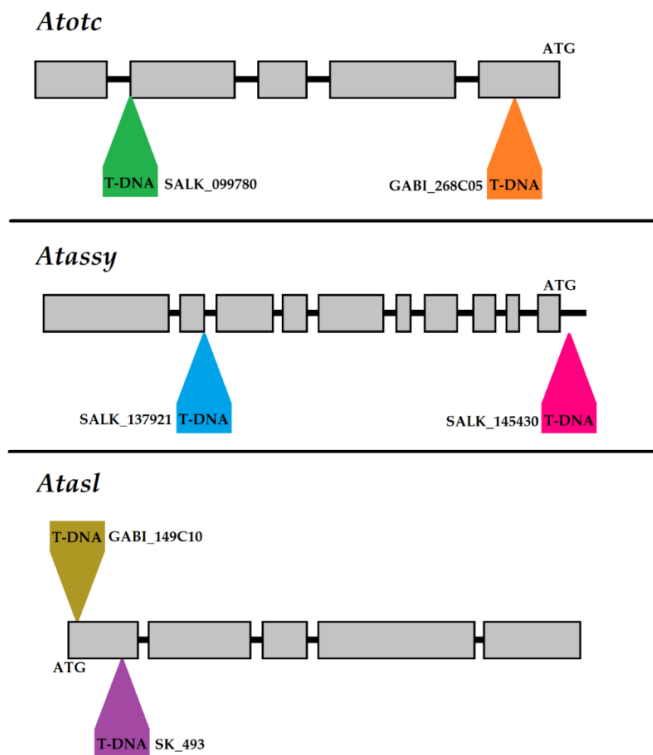


Figura M3. Localización aproximada de las inserciones en las líneas mutantes de *Arabidopsis*, obtenida de la web SIGnAL T-DNA. En las figuras se indican las líneas mutantes seleccionadas, desde las cuales se puede acceder a la información disponible y al sitio web para solicitarlas. Los cuadros grises corresponden a los exones de los genes.

Material y métodos.

Línea mutante	Cebador FW	Cebador RV	Cebador para inserto (LB)	Tamaño amplicón (nt)		
				FW+ RV	FW+ LB	RV+ LB
OTC						
GABI-Kat 268C05	ATGGCGGCTGCAATGGCTTC	GTTTAAATGGTGGCTGTGTC	ATATTGACCATCATACTCATTGC	495	211	442
SALK 099780	GTGAACCATGTTGTTCCCAT	GTAGCTCATT CATATTCC CAGC	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	683	530	603
ASSY						
SALK 145430	GGTTCAGTTATATACGAGAA	GAACCATTGTGGGAGCTACG	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	453	393	523
SALK 137921	CCATGGTGCCACAACITTAAG	GGTTTAGGCAGAATGAGTTG	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	513	228	285
ASL						
GABI-Kat 149C10	GAACAGGGAAACAGAAGAGG	GCAAGCATTGAAGCATGAGC	ATATTGACCATCATACTCATTGC	494	285	367
SK 439	GAACAGGGAAACAGAAGAGG	GCAAGCATTGAAGCATGAGC	TGGACGTGAATGTAGACACGTCG	494	536	496

Tabla M4. Cebadores usados para comprobar la presencia del inserto en el genoma de las líneas mutantes de *Arabidopsis*. LB = “left border”, hace referencia al cebador específico de cada inserción, en función del tipo de inserto que posee esa línea.

Material y métodos

8. Estructura tridimensional de los monómeros de OTC, ASSY y ASL.

Las secuencias de aminoácidos correspondientes a los monómeros de la OTC, ASSY y ASL para los organismos *Pinus pinaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens* fueron editadas para eliminar el péptido de tránsito al cloroplasto, y se enviaron al servicio web Phyre2 para su reconstrucción tridimensional por homología (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2) (Kelley et al., 2015).

Posteriormente, los archivos de estructura tridimensional generados se cargaron en el software ChimeraX (1.2.5) (Goddard et al., 2018), donde se compararon las estructuras generadas contra los monómeros de OTC, ASSY y ASL de *Arabidopsis thaliana* generados por AlphaFold2 y disponibles en la base de datos de Uniprot ([O50039](#) para OTC, [Q9SZX3](#) para ASSY y [Q9LEU8](#) para ASL) y también contra las estructuras de los multímeros para las mismas proteínas ([3UPD](#) para OTC, [1J21](#) para ASSY y [1HY1](#) para ASL).

Resultados

1. Búsqueda, identificación y clonación de los genes correspondientes a las enzimas OTC, ASSY, y ASL.

En trabajos anteriores del laboratorio, se clonaron las secuencias codificantes o CDS de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *Pinus pinaster* con los que se llevaron a cabo estudios de localización subcelular (Llebrés et al., 2018). Los CDS correspondientes a las mismas enzimas de *Arabidopsis thaliana* y *Physcomitrium patens* se clonaron a partir de librerías de cDNA sintetizado a partir de preparaciones de RNA obtenidas de tejidos vegetativos de ambas plantas. Las plántulas de *P. patens* fueron cedidas por el profesor Jesús Vicente Carbajosa. En el caso de *Marchantia polymorpha*, las clonaciones se realizaron usando una librería de cDNA cedida por la doctora Isabel Monte, perteneciente al laboratorio del profesor Roberto Solano (CNB-CSIC).

Una vez clonadas, a cada secuencia se le eliminó la región codificante para el péptido de tránsito al cloroplasto (ptc) mediante PCR. Para determinar la región que correspondía al ptc, se procesaron las secuencias de aminoácidos correspondientes de cada enzima en el servidor TargetP (Almagro-Armenteros et al., 2019), además de usar los resultados de alineamientos, que permiten identificar rápidamente qué regiones podrían pertenecer al ptc. De esta forma, la expresión heteróloga en *E. coli* corresponde de forma aproximada con la forma madura existente en la planta. En su forma biológicamente activa no poseen dicha secuencia y, dado que no se van a procesar en la propia bacteria, es correcto eliminar esta región, previo paso a ser producida, para evitar que interfiera en la actividad de la enzima.

Resultados.

Organismo	Gen	Longitud (nts)	Longitud sin ptc (nts)	Enzima	Longitud (aas)	Longitud sin ptc (aas)
<i>Pinus pinaster</i>	<i>Ppotic</i>	1155	984	PpOTC	384	327
	<i>Ppassy</i>	1539	1218	PpASSY	512	405
	<i>Ppasl</i>	1590	1398	PpASL	529	465
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Atotc</i>	1128	981	AtOTC	375	326
	<i>Atassy</i>	1485	1266	AtASSY	494	421
	<i>Atasl</i>	1554	1419	AtASL	517	472
<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Mpotc</i>	1179	975	MpOTC	392	324
	<i>Mpassy</i>	1554	1278	MpASSY	517	425
	<i>Mpasl</i>	1593	1428	MpASL	530	475
<i>Physcomitrium patens</i>	<i>Ppatotc_1</i>	1608	975	PpatOTC_1	535	324
	<i>Ppatotc_2</i>	1602	975	PpatOTC_2	533	324
	<i>Ppatassy_1</i>	1452	1296	PpatASSY_1	483	431
	<i>Ppatassy_2-</i>	1140	1113	PpatASSY_2	379	370
	<i>Ppatasl</i>	1611	1377	PpatASL	536	458

Tabla R1. Longitud de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas con y sin ptc. Nts = nucleótidos, aas = aminoácidos.

2. Niveles de expresión de los genes de OTC, ASSY y ASL en diferentes organismos y tejidos.

El laboratorio del Prof. F.M. Cánovas dispone de un atlas de microdissección para algunos tejidos de plántulas de pino marítimo (Cañas et al., 2017), desde el cual se puede acceder a información sobre niveles de expresión de los transcritos de la mayoría de genes del genoma. A continuación, se muestran las imágenes con los niveles de expresión normalizados para cada gen y tejido en *P. pinaster* (2.1). Para los niveles de expresión en *Arabidopsis* (2.2) y *Physcomitrium patens* (2.4), se recurrió a la web de Recursos Bio-Analíticos (“Bio-Analitic Resources”, BAR por sus siglas en inglés) de la Universidad de Toronto (www.bar.utoronto.ca), y para los niveles de expresión de *Marchantia* (2.3), se usaron los datos publicados en el artículo de Tan (2021).

En la tabla R2 se recogen los valores máximos y mínimos para cada gen de cada organismo, correspondiendo el máximo al color rojo y el mínimo a color amarillo. Para datos no disponibles, los colores son gris o blanco. Los valores son comparativos intra-organismo, pero no inter-organismo, pues están normalizados de forma independiente.

Resultados.

Organismo	Gen	Máximo	Mínimo
<i>Pinus pinaster</i>	<i>Ppotc</i>	12.91	1.21
	<i>Ppassy</i>	11.43	1.03
	<i>Ppasl</i>	10.05	0.95
<i>Arabidopsis thaliana</i> Panel 1	<i>Atotc</i>	499.65	0
	<i>Atassy</i>	689.28	0
	<i>Atasl</i>	451.5	0
<i>Arabidopsis thaliana</i> Panel 2	<i>Atotc</i>	64.17	0
	<i>Atassy</i>	46.72	0
	<i>Atasl</i>	41.74	0
<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Mpotc</i>	94.6	0
	<i>Mpassy</i>	123.31	0
	<i>Mpasl</i>	38.86	0
<i>Physcomitrium patens</i>	<i>Ppatotc_1</i>	9065.5	0
	<i>Ppatotc_2</i>	10007.6	0
	<i>Ppatassy_1</i>	22380.8	0
	<i>Ppatasl</i>	102.25	0

Tabla R2. Valores máximos y mínimos de expresión para los genes estudiados en cada organismo.

2.1. *Pinus pinaster*.

Los genes correspondientes a estas enzimas se expresan de forma abundante en los meristemos apical y radicular, así como en las acículas emergentes, sin embargo, para los genes *Ppotc* y *Ppasl* hay un cambio entre el mesófilo de las acículas emergentes y las acículas jóvenes, donde se observa que los niveles de expresión descienden en el mesófilo, pero se mantienen en el tejido vascular, hecho que no ocurre para *Ppassy*. Por otro lado, tanto *Ppotc* como *Ppassy* tienen altos niveles de expresión en los cotiledones, mientras que *Ppasl* presenta muy bajos niveles de expresión en la zona vascular de los cotiledones. Por último, *Ppasl* presenta muy bajos niveles de expresión tanto en el córtex del hipocótilo como en la raíz (excepto la zona meristemática).

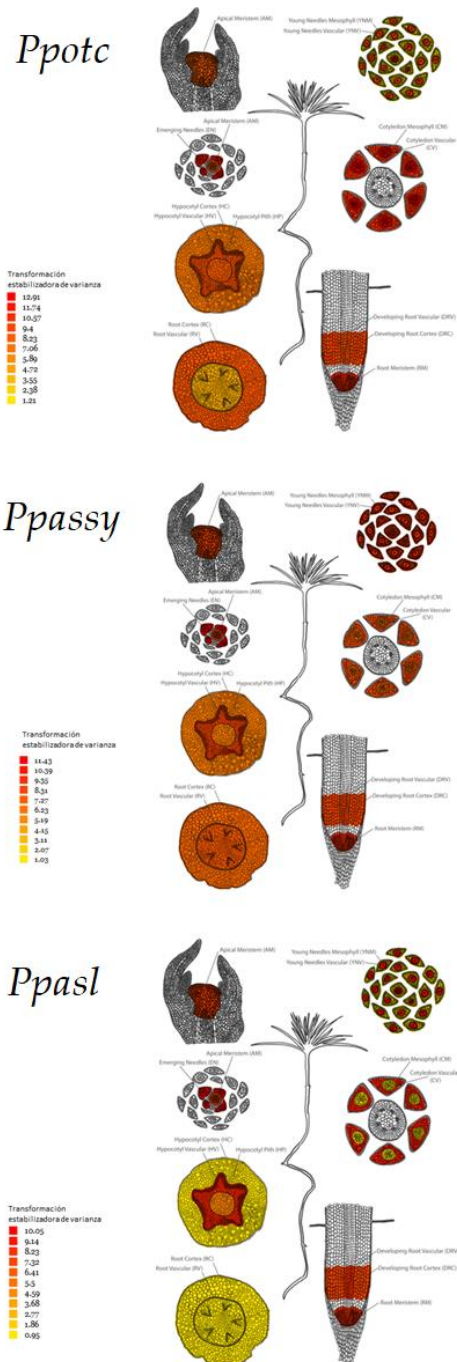


Figura R1. Niveles de expresión de los diferentes genes *Ppotc*, *Ppassy* y *Ppasl* en tejidos de plántula joven de *P. pinaster*, procedente del atlas publicado en Cañas et al., 2017.

Resultados.

2.2. *Arabidopsis thaliana*.

Los genes correspondientes a estas enzimas se expresan de forma abundante en los meristemas apical y radicular (Figura R2, Panel 1). Se observa también una disminución progresiva en los niveles de expresión durante la maduración de la semilla, hasta llegar a 0 expresión en el caso de *Atassy* en la semilla seca (Figura R2, Panel 1). Sin embargo, en todos los casos, estos genes presentan su mayor nivel de expresión en la semilla 24 h después de ser embebida (Figura R2, Panel 1), aunque paulatinamente descienden los niveles según pasa el tiempo (Figura R2, Panel 2). Igualmente ocurre durante la transformación de los tejidos que van a dar lugar a órganos florales, donde los niveles de expresión disminuyen a la par que el tejido se va desarrollando en un órgano floral, hasta llegar a 0 de nuevo en el polen maduro (Figura R2, Panel 1). Las hojas de la roseta presentan altos niveles de expresión de estos genes, pues son el tejido con mayor abundancia de cloroplastos, orgánulo donde ocurre la síntesis de arginina, y también se observa una disminución en estos tejidos cuando la planta florece (Figura R2, Panel 1). Durante el desarrollo de la hoja también disminuyen los niveles de expresión de todos los genes excepto justo antes de entrar en senescencia (Figura R2, Panel 1 y 2). De los tres genes analizados, *Atotc* es el gen que mayores niveles de expresión mantiene con respecto a su propio máximo en la mayoría de los tejidos, lo que podría indicar una menor especificidad de expresión.

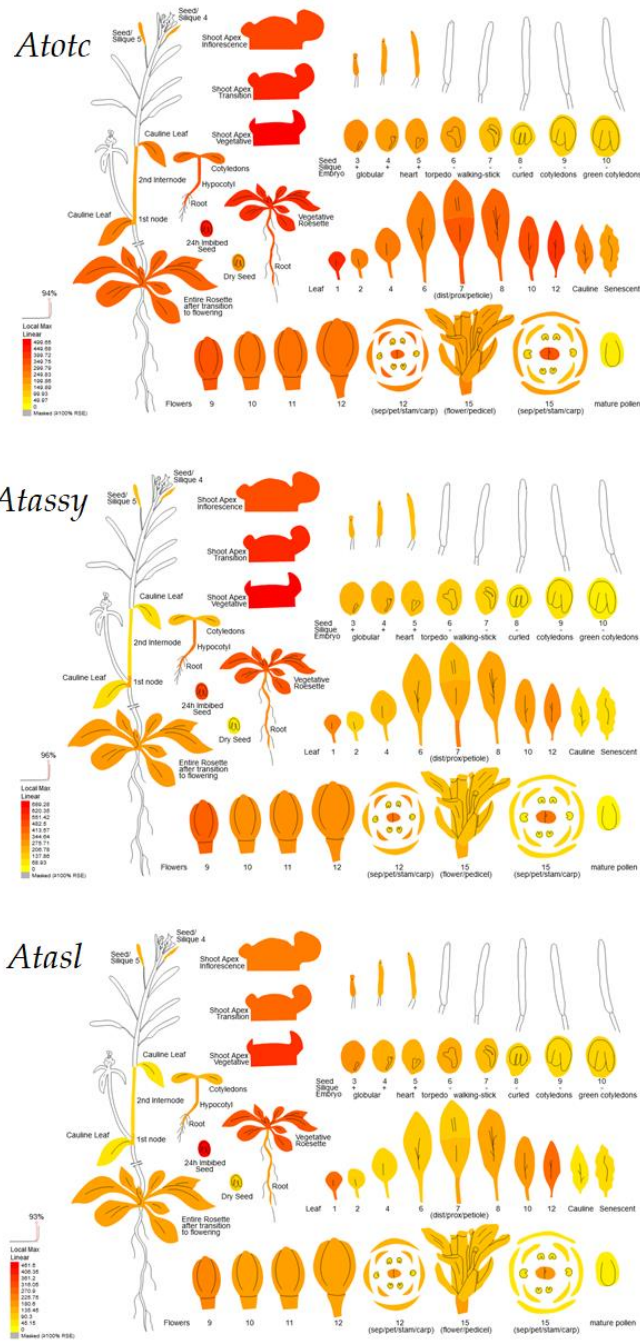


Figura R2. Panel 1. Niveles de expresión de los genes *AtOTC*, *AtASSY* y *AtASL* en diferentes tejidos y estados de desarrollo del organismo *A. thaliana*.

Resultados.

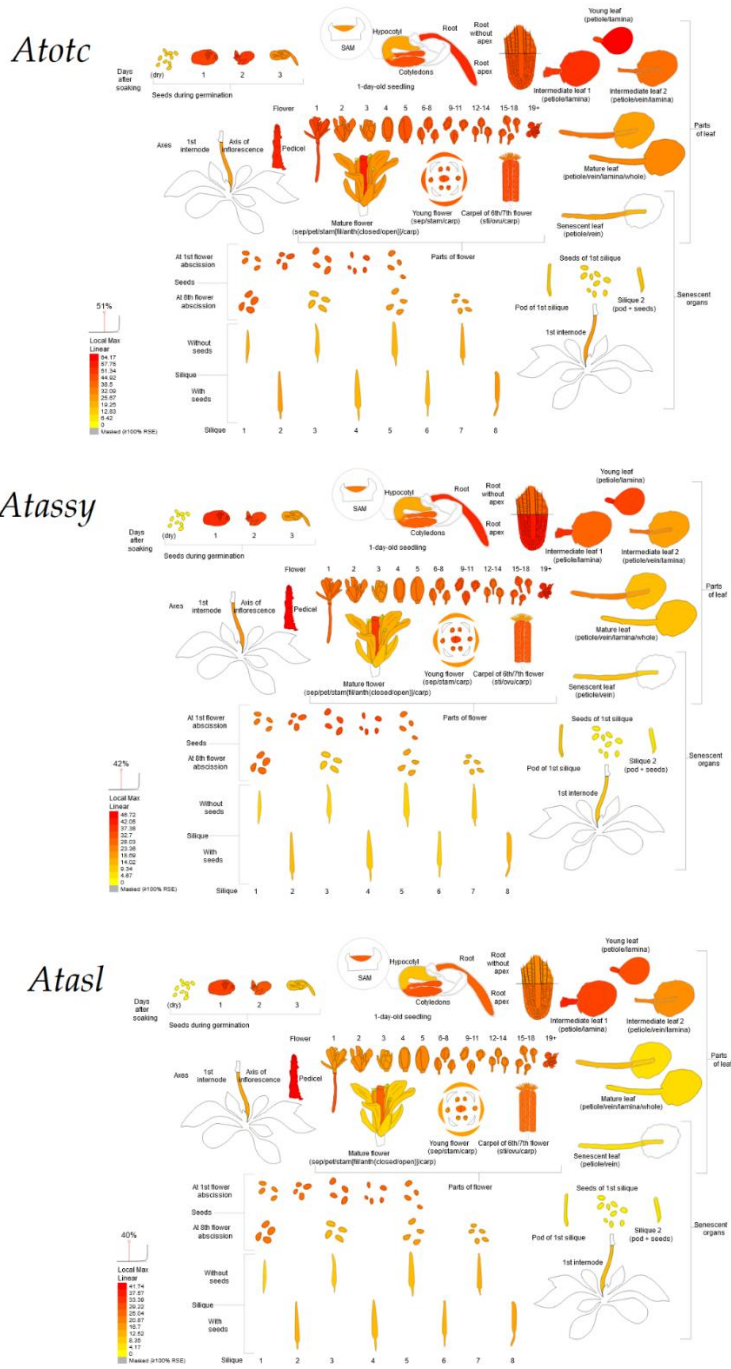


Figura R2. Panel 2. Niveles de expresión de los genes *AtOTC*, *AtASSY* y *AtASL* en detalle para tejidos y estados de desarrollo concretos del organismo *A. thaliana*.

2.3. *Marchantia polymorpha*.

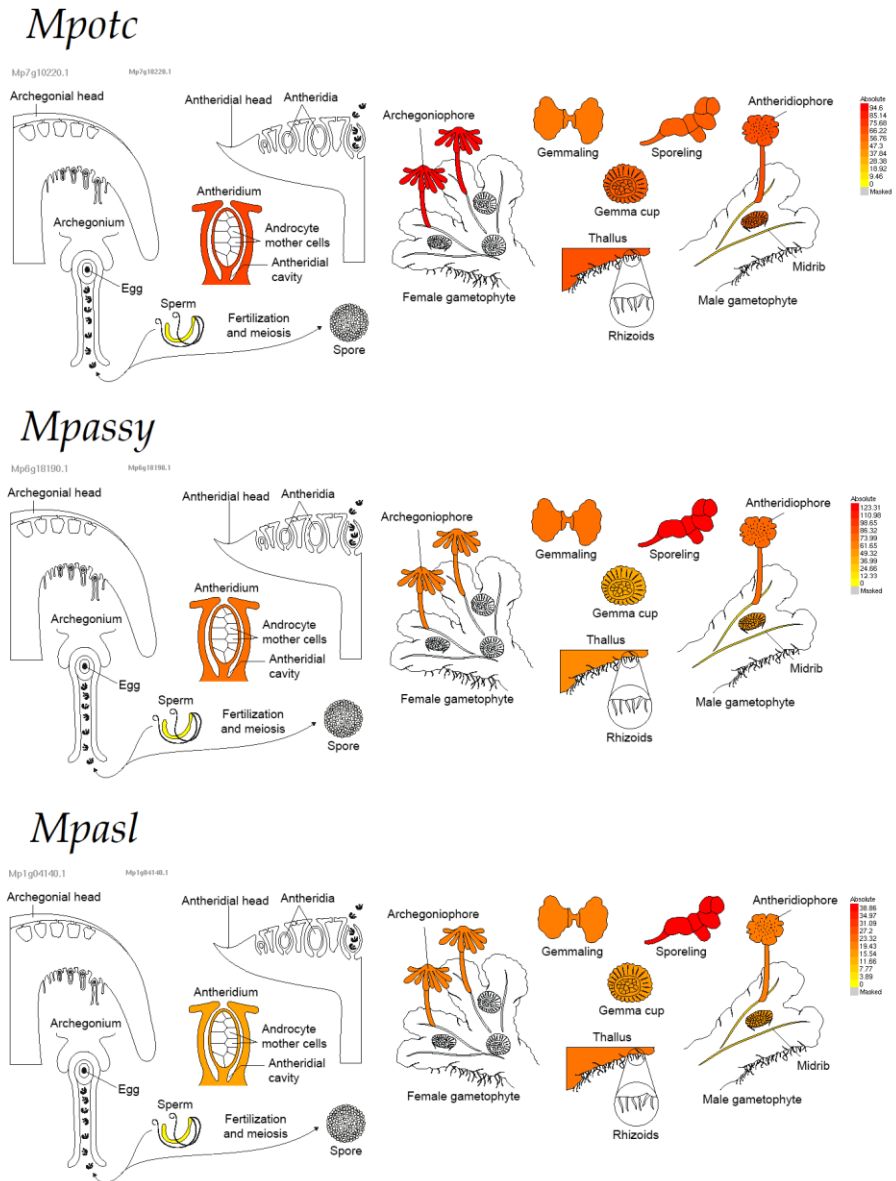


Figura R3. Niveles de expresión de los genes *Mpotc*, *Mpassy* y *Mpasl* en diferentes tejidos y órganos del organismo *M. polymorpha*.

Resultados.

En el caso de *M. polymorpha* se dispone de menos información en cuanto a los niveles de expresión, por tratarse de una única fuente de datos. Aun así, se pueden observar diferencias entre ciertos órganos y tejidos, como en el caso de la espora germinante, donde tienen los mayores niveles de expresión *Mpassy* y *MpasL*, mientras que el mayor nivel de expresión para *Mpotc* se encuentra en el arquegonióforo. En el talo fotosintético, todos los genes tienen niveles medio-altos de expresión mientras que apenas se expresan en el anterozoide.

2.4. *Physcomitrium patens*.

Para *P. patens* también se dispone de una única fuente de datos, pero al igual que en *M. polymorpha*, se pueden observar diferencias entre algunos tejidos, la más destacable es la diferencia entre protonema y caulonema en cuanto a los niveles de expresión de *Ppatasl*. Además, existe una diferencia muy alta en general entre los niveles de expresión absolutos de *Ppatassy* y *Ppatotc* (1 y 2) respecto a *Ppatasl*, pues mientras que esta última se mueve en valores entre 0 y 102, *Ppatassy* y *Ppatotc* (1 y 2) presentan valores de miles (Tabla R2). Ambas *Ppatotc* presentan valores similares en los tejidos analizados, a excepción del gametóforo, donde *Ppatotc-2740* presenta aproximadamente la mitad de expresión que *Ppatotc-7070*.

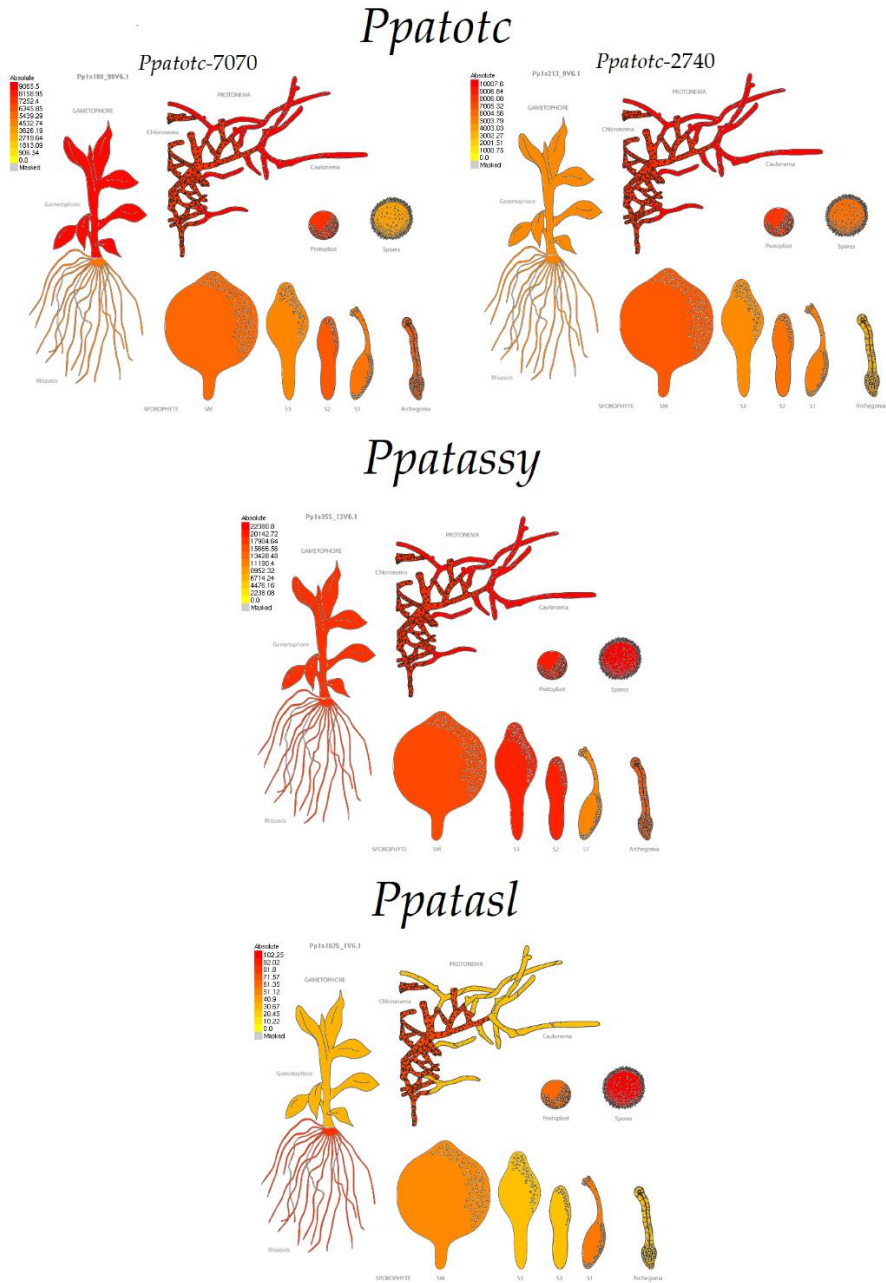


Figura R4. Niveles de expresión de los genes *Ppatotc* (Pp3c15_7070V3.1 izquierda y Pp3c9_2740V3.1 derecha), *Ppatassy* y *Ppatasl* en diferentes tejidos del organismo *P. patens*.

Resultados.

3. Estructura tridimensional de las proteínas OTC, ASSY y ASL.

Entre los objetivos de esta tesis se encuentra el estudio de la estructura tridimensional de estas enzimas, para estudiar los posibles cambios estructurales que pudieran derivarse de cambios en la secuencia de aminoácidos. Las secuencias correspondientes a los 4 organismos de este trabajo fueron alineadas entre sí, y se identificaron los dominios conservados involucrados en la actividad catalítica con respecto a sus secuencias homólogas en animales y otros organismos, para las que existían disponibles datos de estructuras 3D previamente resueltas mediante cristalografía procedentes de las bases de datos Uniprot (www.uniprot.org) y RCS-PDB (www.rcsb.org). Mediante este estudio comparado se pudieron determinar las regiones conservadas implicadas en el mecanismo catalítico de estas enzimas.

A partir de la base de datos de estructuras tridimensionales de AlphaFold2 alojada en Uniprot, se obtuvo la estructura tridimensional de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *Arabidopsis thaliana*. Estas estructuras sirvieron para validar los resultados obtenidos en el modelado tridimensional de las mismas proteínas de los organismos *Pinus pinaster*, *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens* a través del servicio de modelado tridimensional Phyre2 (Kelley et al., 2015) (www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2), puesto que, hoy en día, las estructuras resueltas mediante el algoritmo AlphaFold2 son las más aceptadas (Jumper et al., 2021).

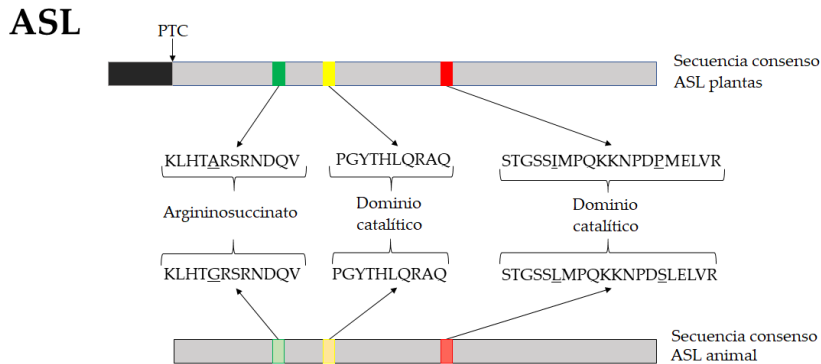
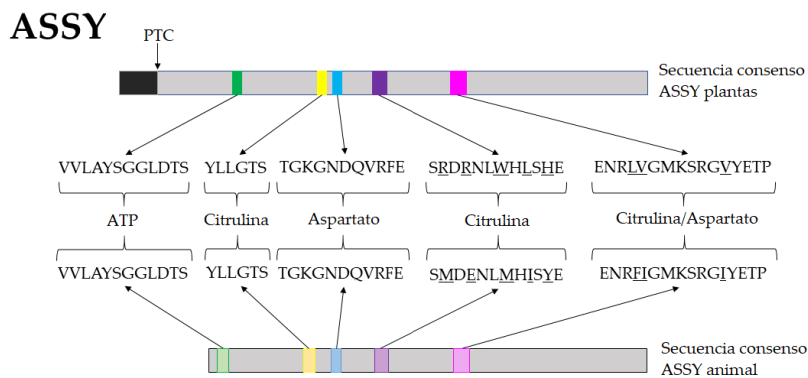
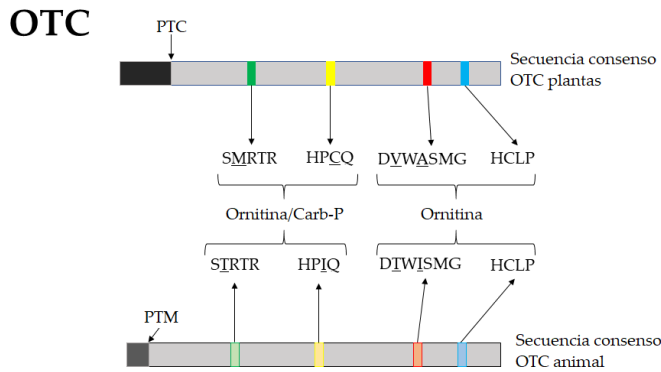


Figura R5. Comparación de dominios conservados entre las secuencias de plantas y animales, donde los residuos que varían entre los grupos aparecen subrayados. El grupo de secuencias correspondientes a animales proceden de los organismos *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Danio rerio*, *Bos taurus*, *Anas platyrhynchos* y *Rattus norvegicus*. PTC: péptido de tránsito al cloroplasto. PTM: péptido de tránsito a la mitocondria. Figura modificada de Urbano-Gamez et al., 2020).

Resultados.

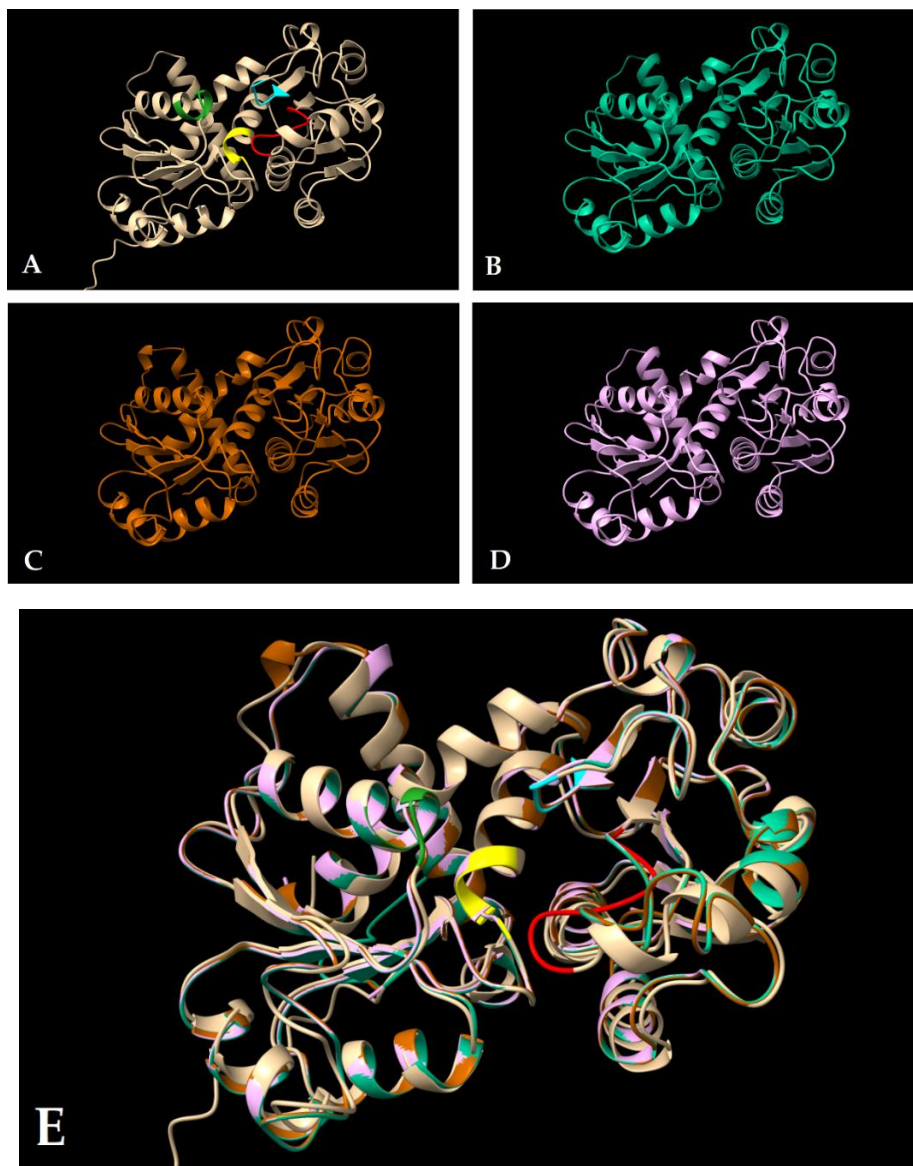


Figura R6. Superposición de los monómeros de la proteína OTC de *P. pinaster* (turquesa, B), *M. polymorpha* (marrón, C) y *P. patens* (rosa, D) sobre el monómero de *A. thaliana* (beige, A) en la imagen E. Los principales dominios del centro activo se destacan en colores verde, amarillo, rojo y azul, siguiendo el orden de la figura R5.

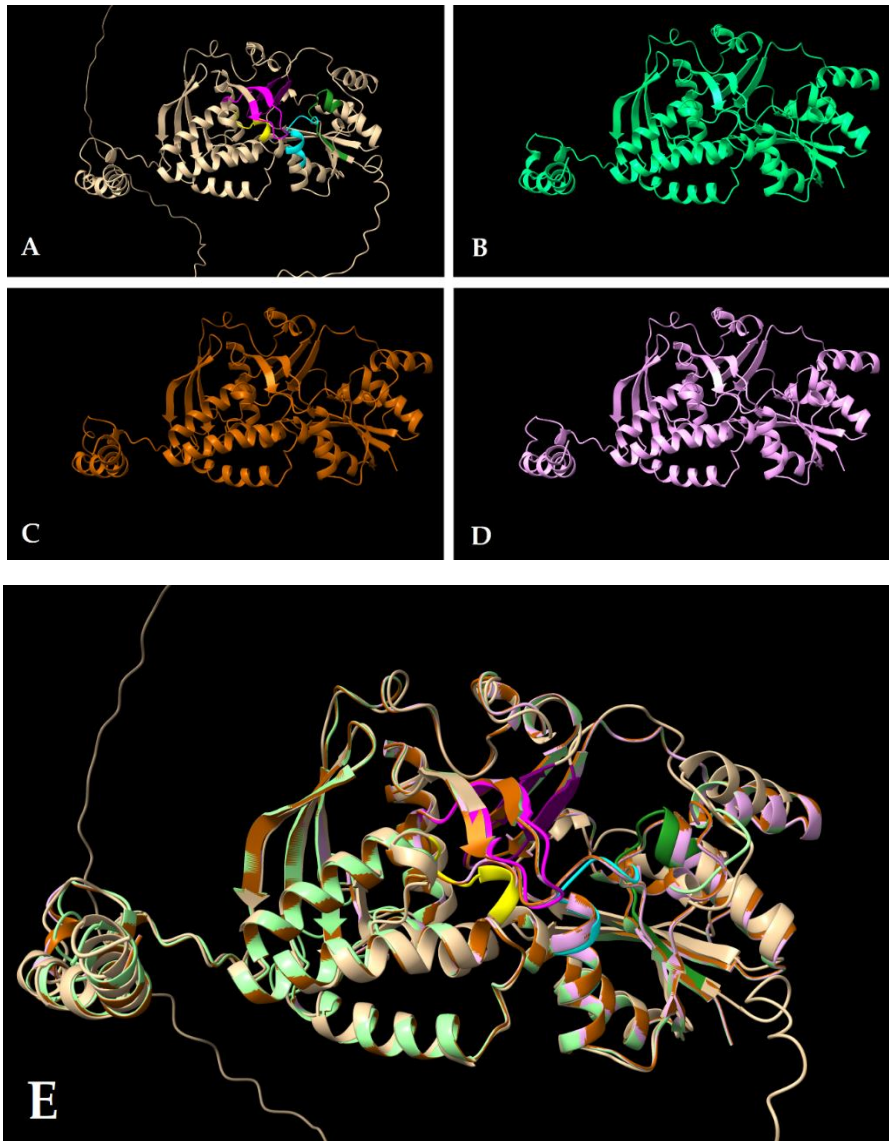


Figura R7. Superposición de los monómeros de la proteína ASSY de *P. pinaster* (turquesa, B), *M. polymorpha* (marrón, C) y *P. patens* (rosa, D) sobre el monómero de *A. thaliana* (beige, A) en la imagen E. Los principales dominios del centro activo se destacan en colores verde, amarillo, azul, violeta y magenta, siguiendo el orden de la figura R5.

Resultados.

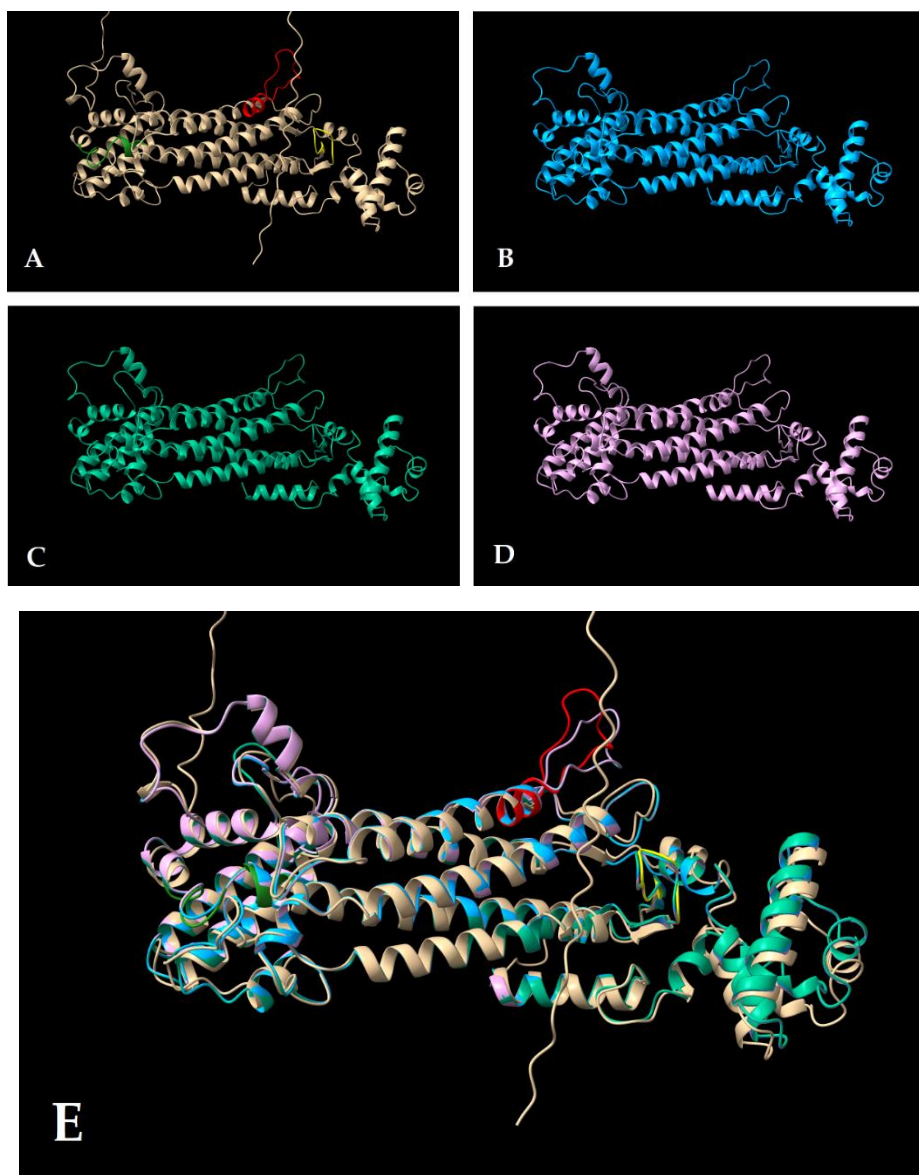


Figura R8. Superposición de los monómeros de la proteína ASSY de *P. pinaster* (turquesa, B), *M. polymorpha* (marrón, C) y *P. patens* (rosa, D) sobre el monómero de *A. thaliana* (beige, A) en la imagen E. Los principales dominios del centro activo se destacan en colores verde, amarillo y rojo, siguiendo el orden de la figura R5.

Resultados.

Se puede observar cómo, en todos los casos, hay una alta homología entre las estructuras de los monómeros, incluyendo las regiones determinantes del centro activo.

Las estructuras tridimensionales de los monómeros de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *A. thaliana* procedentes de AlphaFold2 se compararon con las estructuras tridimensionales de los complejos multiméricos, procedentes de *Vibrio vulnificus* (para OTC), *Thermus thermophilus* (para ASSY) y *Anas platyrhynchos* (para ASL), pues son los modelos que más resolución tienen y que han sido más estudiados en detalle, para así aproximar la estructura multimérica de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *P. pinaster*, *A. thaliana*, *M. polymorpha* y *P. patens*.

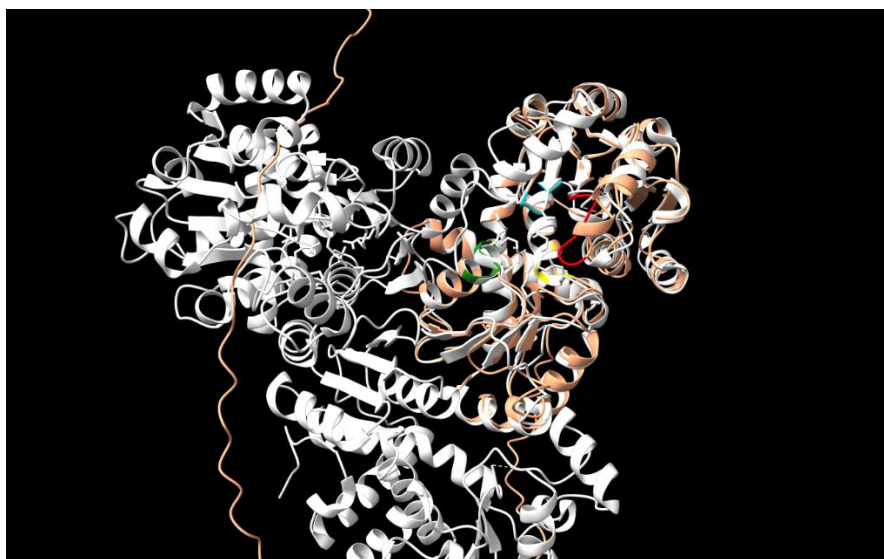


Figura R9. Modelo tridimensional del monómero de la enzima OTC de *A. thaliana* (beige) superpuesto sobre el trímero de *V. vulnificus* (blanco), de nuevo con las regiones determinantes del centro activo destacadas.

Es de destacar que en el caso del tetrámero de la proteína ASL, las regiones que conforman el centro activo corresponden a diferentes

Resultados.

monómeros, donde cada monómero participa hasta en tres centros activos diferentes. Para el trímero de OTC y el tetramero de ASSY, cada monómero conforma un centro activo.

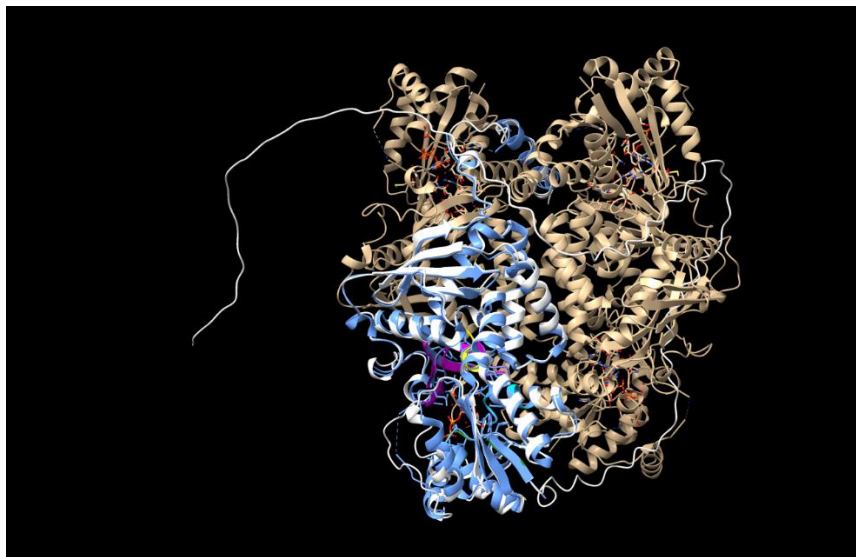


Figura R10. Modelo tridimensional del monómero de la enzima ASSY de *A. thaliana* (blanco) superpuesto sobre el tetramero de *T. thermophilus* (azul y beige), de nuevo con las regiones determinantes del centro activo destacadas.

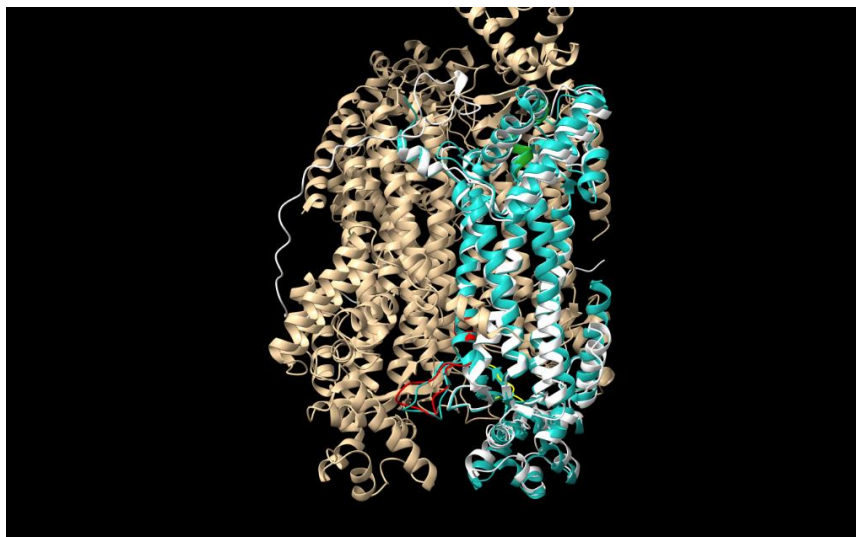


Figura R11. Modelo tridimensional del monómero de la enzima ASL de *A. thaliana* (blanco) superpuesto sobre el tetramero de *A. platyrhynchos* (azul y beige), de nuevo con las regiones determinantes del centro activo destacadas.

4. Cálculo de las masas moleculares de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *Pinus pinaster*.

Las proteínas PpOTC, PpASSY y PpASL de *P. pinaster* se expresaron de forma recombinante en *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA. Con el objetivo de determinar la masa molecular de estas enzimas, se procedió a utilizar una cromatografía de filtración en gel, previamente calibrada con un patrón de proteínas de peso molecular conocido (Figura R12). La holoenzima PpOTC purificada mostró un peso molecular estimado de 112 kDa, que corresponde a 2.9 veces la masa estimada del correspondiente monómero de PpOTC (38 kDa), lo cual es consistente con una estructura homotrimérica. Para la holoenzima PpASSY, se obtuvo un peso molecular estimado de 193 kDa, que nuevamente con relación al peso molecular estimado del monómero (47 kDa) es 4.1 veces mayor, lo cual sugiere una estructura cuaternaria de homotetrámero. Finalmente, se determinó un peso molecular estimado de 208 kDa para la holoenzima de PpASL, aproximadamente 3.8 veces el peso molecular estimado del monómero (54 kDa), lo cual sugiere una estructura cuaternaria de homotetrámero. Estos resultados son consistentes con las estructuras previamente descritas en la bibliografía para bacterias, animales y plantas.

Resultados.

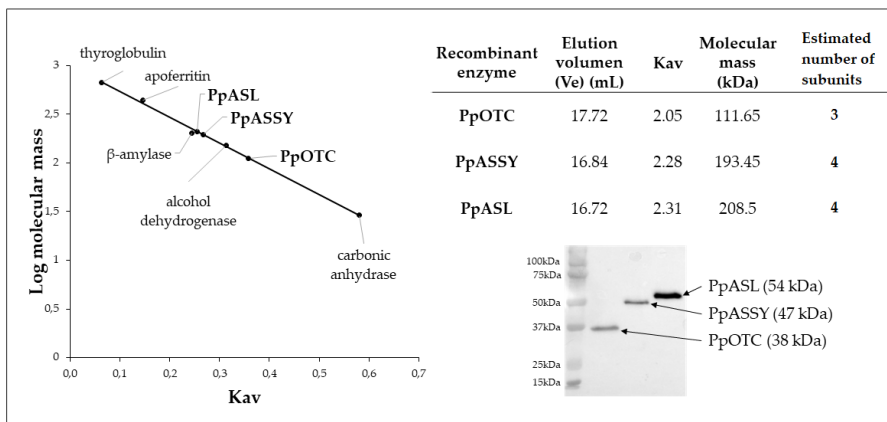


Figura R12. Estimaciones de las masas moleculares de las enzimas PpOTC, PpASSY y PpASL. Las muestras procedentes de eluciones purificadas fueron cargadas por separado en una columna de exclusión en gel modelo ENrich™ SEC 650 (Bio-Rad). Las masas moleculares fueron calculadas a partir del coeficiente de partición (K_{av}) comparado con el de las muestras usadas para calibrar la columna: tiroglobulina (669 kDa), apoferritina (443 kDa), β -amilasa (200 kDa), alcohol deshidrogenasa (150 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa).

5. Parámetros cinéticos de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *Pinus pinaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens*.

Existe numerosos estudios hechos sobre la caracterización cinética de las enzimas OTC, ASSY y ASL, principalmente en microorganismos y animales, por su relación en estos últimos con el ciclo de la urea. Sin embargo, la información relativa a las mismas enzimas en plantas que se encuentra en la bibliografía era muy reducida, por lo que se consideró relevante estudiar las características cinéticas de estas enzimas con el fin de profundizar en los mecanismos que rigen el flujo de nitrógeno a través de esta ruta.

Resultados.

Para ello, a partir de las fracciones purificadas de las proteínas recombinantes, se calcularon los valores de sus parámetros cinéticos: K_m , $S_{0.5}$, V_{max} , nH , k_{cat} y K_{cat}/K_m según correspondiese.

Para las enzimas PpOTC, AtOTC y MpOTC se observa un marcado comportamiento cooperativo para el sustrato ornitina, apoyado por un alto índice de Hill. Sin embargo, las enzimas no parecen presentar un comportamiento cooperativo para el carbamoil-P, excepto el caso de PpatOTC, que aparentemente presenta cooperatividad para ambos sustratos.

En el caso de las enzimas ASSY, por un lado, PpASSY y AtASSY presentan una cinética de tipo Michaelis-Menten para ambos sustratos, y, por otro lado, MpASSY presenta cooperatividad para ambos sustratos, sustentado por un índice de Hill alto. Los valores de K_m para ambos sustratos se mantienen muy parecidos en cada enzima.

Por último, las enzimas ASL presentan todas unas cinéticas de tipo Michaelis-Menten, con valores de V_{max} muy diferentes para valores de K_m parecidos.

Los valores se recogen en las siguientes tablas.

Resultados.

Enzima	Sustrato	K_m (mM)	$S_{0.5}$ (mM)	V_{max} (nkat/ μ g)	nH	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m
PpOTC	ornitina carbamoil-P	3.48 ± 1.4	1.28 ± 0.16	4.44 ± 1.4	3.47 ± 0.38	11.03	
AtOTC	ornitina carbamoil-P	0.28 ± 0.05	0.25 ± 0.03	1.38 ± 0.12	3.43 ± 1.82	54	
MpOTC	ornitina carbamoil-P	0.42 ± 0.1	0.28 ± 0.02	1.62 ± 0.06	2.63 ± 0.48	56.2	
PpatOTC	ornitina carbamoil-P		0.36 ± 0.05 1.07 ± 0.05	0.19 ± 0.02	4.06 ± 2.22 3.06 ± 0.49	6.27	

Tabla R3. Parámetros cinéticos para la enzima OTC recombinante de los diferentes organismos estudiados. En todos los casos se trata de enzimas alostéricas, con lo cual no se puede obtener un valor de K_m y, por ende, tampoco de K_{cat}/K_m .

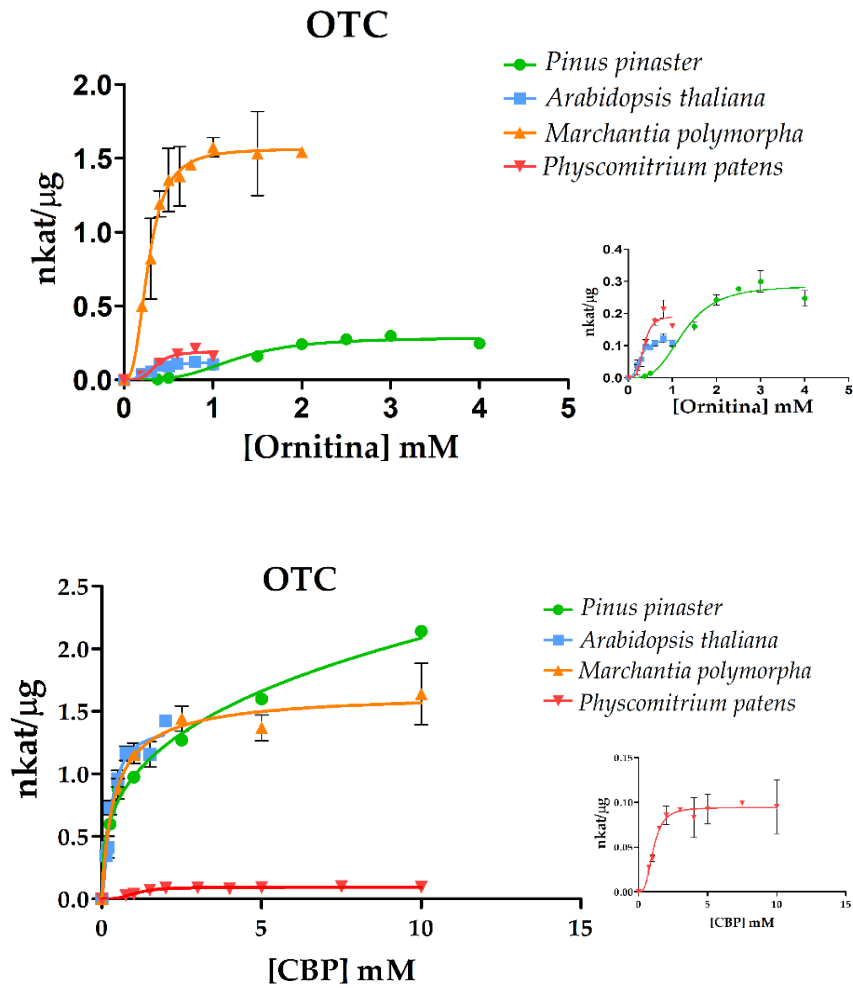


Figura R13. Gráficas de actividad específica para las enzimas PpOTC, AtOTC, MpOTC y PpatOTC en presencia de sustrato limitante ornitina y CBP. Las gráficas de menor tamaño sirven para detallar a menor escala las curvas de actividad.

Resultados.

Enzima	Sustrato	K_m (mM)	$S_{0.5}$ (mM)	V_{max} (nkat/ μ g)	nH	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m
PpASSY	citrulina aspartato	0.12 ± 0.03 0.12 ± 0.05		0.07 ± 0.01		2.82	2.46×10^4
AtASSY	citrulina aspartato	0.12 ± 0.03 0.13 ± 0.04		2.09 ± 0.18		105.62	5.92×10^5
MpASSY	citrulina aspartato		0.24 ± 0.02 0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.02	3.38 ± 0.95 3.05 ± 0.99	11.55	
PpatASSY	citrulina aspartato	n.c.		n.c.		n.c.	n.c.

Tabla R4. Parámetros cinéticos para la enzima ASSY recombinante de los diferentes organismos estudiados. En el caso de *Marchantia polymorpha*, se trata de una enzima de comportamiento alostérico, con lo cual no se puede obtener un valor de K_m y, por ende, tampoco de K_{cat}/K_m . n.c. = valor no calculado.

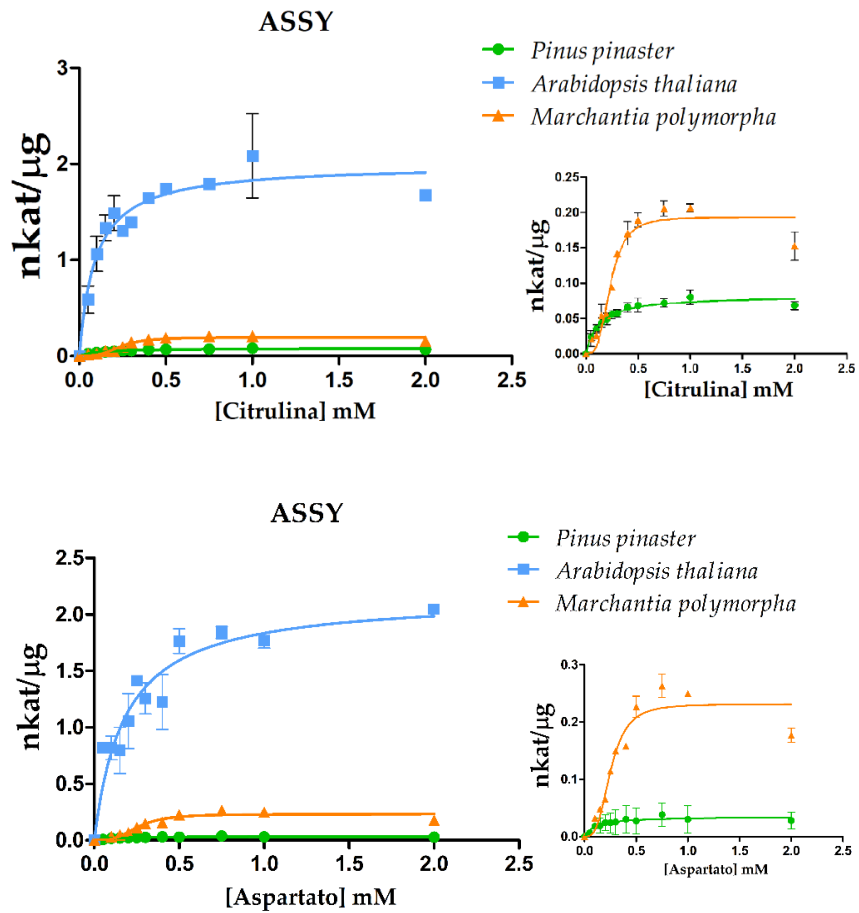


Figura R14. Gráficas de actividad específica para las enzimas PpASSY, AtASSY y MpASSY en presencia de sustrato limitante aspartato y citrulina. Las gráficas de menor tamaño sirven para detallar a menor escala las curvas de actividad.

Resultados.

Enzima	Sustrato	K_m (mM)	$S_{0.5}$ (mM)	V_{max} (nkat/ μ g)	nH	K_{cat} (s ⁻¹)	K_{cat}/K_m
PpASL	argininosuccinato	0.22 ± 0.04		20.93 ± 0.96		1139.24	5.14 × 10 ⁶
AtASL	argininosuccinato	0.26 ± 0.03		2408.05 ± 83.34		1.33 × 10 ⁵	5.07 × 10 ⁸
MpASL	argininosuccinato	0.66 ± 0.07		223.31 ± 7.66		1.3 × 10 ⁴	1.63 × 10 ⁷
PpatASL	argininosuccinato	n.c.		n.c.		n.c.	n.c.

Tabla R5. Parámetros cinéticos para la enzima ASL recombinante de los diferentes organismos estudiados. En todos los casos estudiados estas enzimas presentan una cinética Michaeliana. n.c. = valor no calculado.

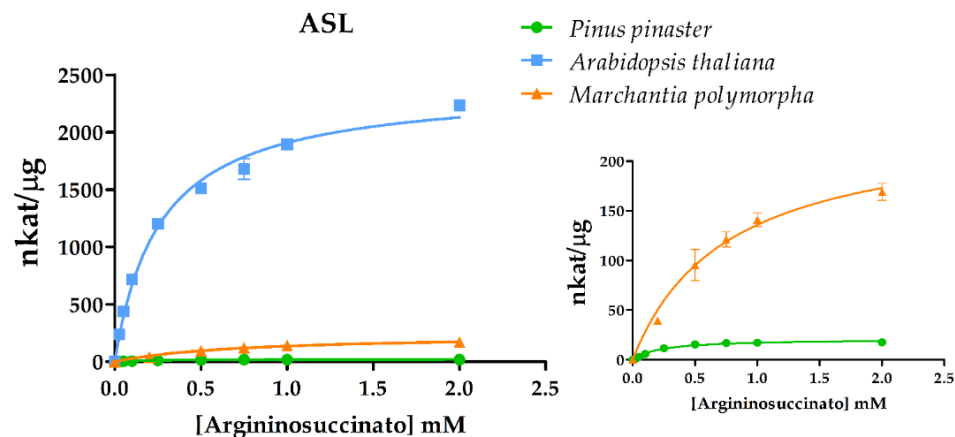


Figura R15. Gráficas de actividad específica para las enzimas PpASL, AtASL y MpASL en presencia de sustrato limitante argininosuccinato. La gráfica de menor tamaño sirve para detallar a menor escala las curvas de actividad.

6. Efectos de diferentes metabolitos sobre la actividad de las enzimas recombinantes OTC, ASSY y ASL de *Pinus pinaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens*.

Estudios previos sobre la biosíntesis de aminoácidos (Sander et al., 2019) han demostrado que los aminoácidos juegan un papel muy importante en la regulación de su propia biosíntesis, bien sea inhibiendo la expresión de enzimas implicadas en su biosíntesis, o modulando la actividad de las propias enzimas de forma alostérica. Particularmente, para el aminoácido arginina, se ha descrito que es capaz de regular su biosíntesis influyendo de forma alostérica sobre la actividad de la enzima NAGS/K (ArgA) en procariotas, y NAGK en plantas (Winter et al., 2015).

Con estos precedentes, y con el fin de identificar posibles mecanismos de regulación mediada por metabolitos de las enzimas OTC, ASSY y ASL de plantas, diferentes compuestos fueron añadidos a la reacción enzimática para observar si influían en la actividad de las enzimas recombinantes. Las gráficas a continuación muestran la reducción o el aumento de la actividad enzimática, en porcentaje respecto al control (100%). Pro = prolina, Thr = treonina, Leu = leucina, Ile = isoleucina, Arg = arginina, Val = valina, Asn = asparagina, Asp = aspartato, Gln = glutamina, Glu = glutamato, Spd = espermidina, Spm = espermina, Putr = putrescina. Todos los metabolitos se ensayaron a una concentración igual a 10 mM. Para determinar valores estadísticamente significativos se usó el método de Dunnett.

Resultados.

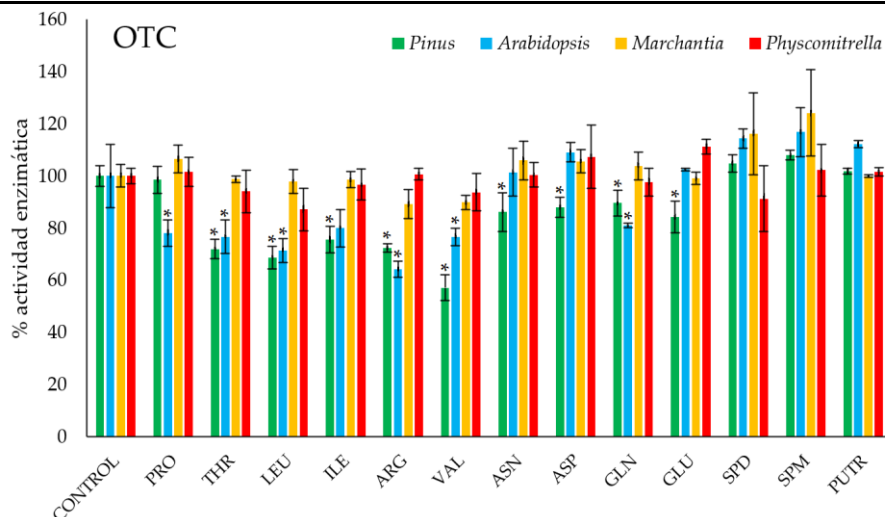


Figura R16. Efecto de los diferentes metabolitos sobre la actividad de la enzima recombinante OTC en cada uno de los organismos analizados. 100 % actividad en *P. pinaster* = 2.2 ± 0.1 nkat/ μ g; 100 % actividad en *A. thaliana* = 2.01 ± 0.25 nkat/ μ g; 100 % actividad en *M. polymorpha* = 6.17 ± 0.26 nkat/ μ g; 100 % actividad en *P. patens* = 0.49 ± 0.02 nkat/ μ g. Las condiciones del ensayo fueron 3 mM ornitina, 10 mM CBP, Tris 50 mM, pH = 8 y 5 min de incubación de la reacción.

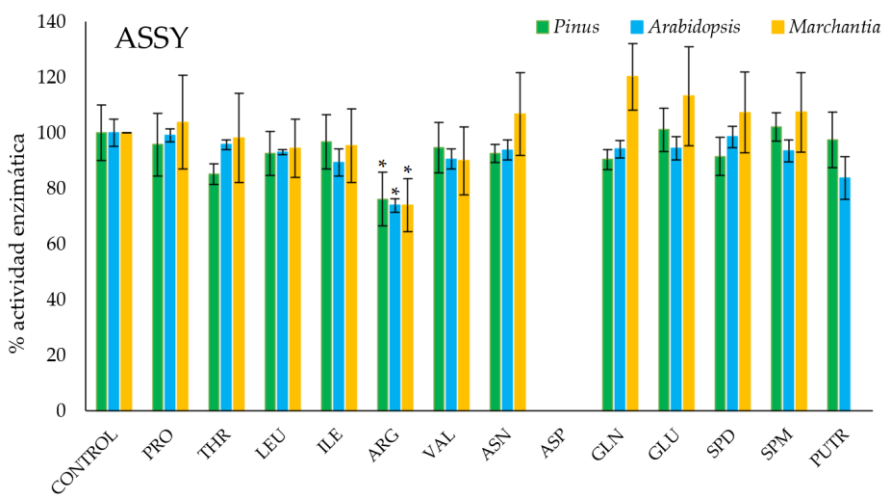


Figura R17. Efecto de los diferentes metabolitos sobre la actividad de la enzima recombinante ASSY en cada uno de los organismos analizados. 100 % actividad en *P. pinaster* = 0.2 ± 0.02 nkat/ μ g; 100 % actividad en *A. thaliana* = 0.13 ± 0.01 nkat/ μ g; 100 % actividad en *M. polymorpha* = 0.29 ± 0.04 nkat/ μ g. Las condiciones del ensayo fueron 2 mM citrulina, 2 mM aspartato, 3 mM ATP, 10mM MgCl₂, Tris 50 mM, pH = 8 y 5 min de incubación de la reacción. * indica un valor estadísticamente significativo.

Resultados.

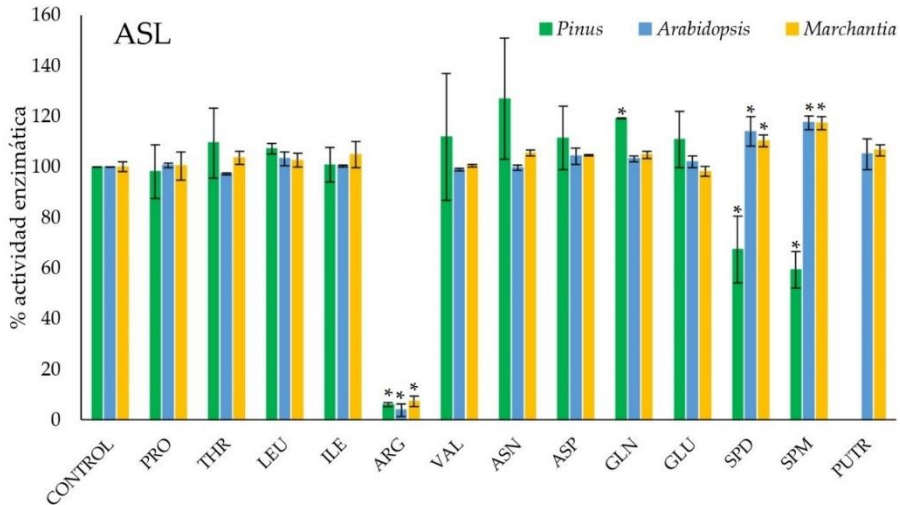


Figura R18. Efecto de los diferentes metabolitos sobre la actividad de la enzima recombinante ASL en cada uno de los organismos analizados. 100 % actividad en *P. pinaster* = 15.63 ± 0.41 nkat/ μ g; 100 % actividad en *A. thaliana* = 1797.58 ± 245.26 nkat/ μ g; 100 % actividad en *M. polymorpha* = 414 ± 1.21 nkat/ μ g. Las condiciones del ensayo fueron 1 mM argininosuccinato, Tris 50 mM, pH = 8 y 5 min de incubación de la reacción. * indica un valor estadísticamente significativo.

Como se observa en la primera gráfica (Figura R16), la enzima OTC de *P. pinaster* y de *A. thaliana* son las más sensibles a diferentes metabolitos, pues en ambos casos presentan una reducción de actividad enzimática en presencia de treonina, leucina, isoleucina, arginina y valina entre un 20 % y un 40 %, y ligeramente también para glutamina. En el caso de la OTC de *A. thaliana*, también es de destacar la inhibición por prolina. Por el contrario, en las enzimas correspondientes a las plantas evolutivamente más basales, no se observa dicha reducción, o si cabe, una ligera reducción de actividad en el caso de la OTC de *M. polymorpha* en presencia de arginina y valina. Por otro lado, en el caso de las poliaminas, se observa un incremento en la actividad enzimática de las OTC de *M. polymorpha* y *A. thaliana* cuando están en presencia de

Resultados.

espermina y espermidina, aunque sí que hay una leve reducción de actividad cuando la OTC de *P. patens* se pone en presencia de espermina. Sin embargo, no se observan cambios en la actividad de las OTC en presencia de putrescina, para ninguno de los organismos.

En el caso de la enzima ASSY (Figura R17), apenas se observa un cambio sensible de la actividad en presencia de los diferentes metabolitos ensayados. Únicamente para la arginina se reduce la actividad hasta aproximadamente un 75 % en todos los organismos, mientras que, en el caso particular de *M. polymorpha*, en presencia de asparagina, glutamina, glutamato y las poliaminas espermidina y espermina se observa un aumento de la actividad enzimática. La actividad enzimática en presencia de aspartato no fue determinada debido a que es sustrato de la propia reacción.

Por último, para la enzima ASL (Figura R18) se observa una reducción importante de la actividad en presencia de arginina, y esto es debido a que, al ser uno de los productos finales de la reacción, la actividad enzimática se reduce muchísimo por exceso de producto. Por otro lado, se observa un efecto diferente en presencia de poliaminas, ya que, tanto en presencia de espermina y espermidina, las enzimas ASL de *A. thaliana* y de *M. polymorpha* aumentan su actividad, no siendo así en *P. pinaster*, donde se puede observar una disminución de la actividad hasta alrededor del 60 %. En el caso concreto de la ASL de *P. pinaster*, su actividad se ve aumentada de forma significativa en presencia de glutamina (20 %) y asparagina (26 %) respecto al control, aunque el caso de asparagina no es estadísticamente significativo.

Resultados.

Se comparó el efecto sobre la actividad de las enzimas PpOTC, AtOTC y MpOTC de la arginina y la valina a diferentes concentraciones. Las gráficas muestran cómo a medida que aumenta la concentración de arginina y valina, disminuye la actividad de las enzimas, pero sin llegar a inhibirse por completo.

En las gráficas se puede observar cómo a medida que aumenta la concentración de arginina y valina, se reduce la actividad enzimática. En el caso de la OTC de *P. pinaster*, la valina ejerce un papel inhibitorio mayor que la arginina, alcanzando una reducción máxima de la actividad enzimática de un 76 % respecto del control, frente al 62 % que se alcanza con la arginina.

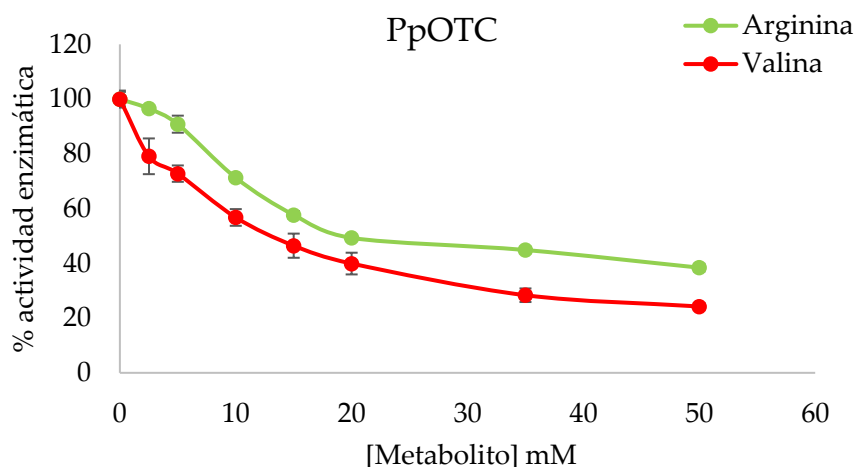


Figura R19. Disminución de la actividad enzimática de la proteína recombinante OTC de *P. pinaster*. La actividad específica equivalente al 100 % es 2.3 ± 0.1 nkat/ μ g. La máxima reducción de la actividad se observa a 50 mM tanto para arginina como valina, con valores de 38 % y 24 % respectivamente. Las condiciones del ensayo fueron 3 mM ornitina, 10 mM CBP, Tris 50 mM, pH = 8 y 5 min de incubación de la reacción.

Resultados.

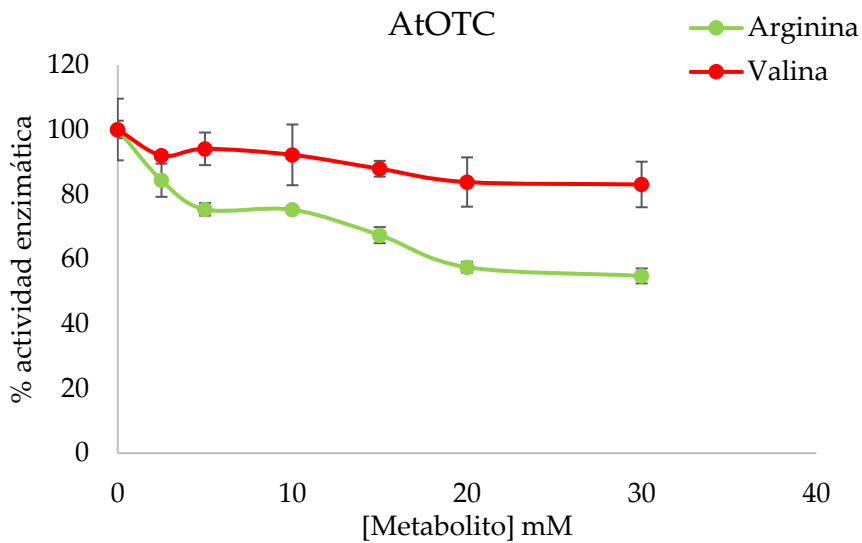


Figura R20. Disminución de la actividad enzimática de la proteína recombinante OTC de *Arabidopsis thaliana*. La actividad específica equivalente al 100 % es 1.84 ± 0.12 nkat/ μ g. La máxima reducción de la actividad se observa a 30 mM tanto para arginina como valina, con valores de 83 % y 55 % respectivamente. Las condiciones del ensayo fueron 3 mM ornitina, 10 mM CBP, Tris 50 mM, pH = 8 y 5 min de incubación de la reacción.

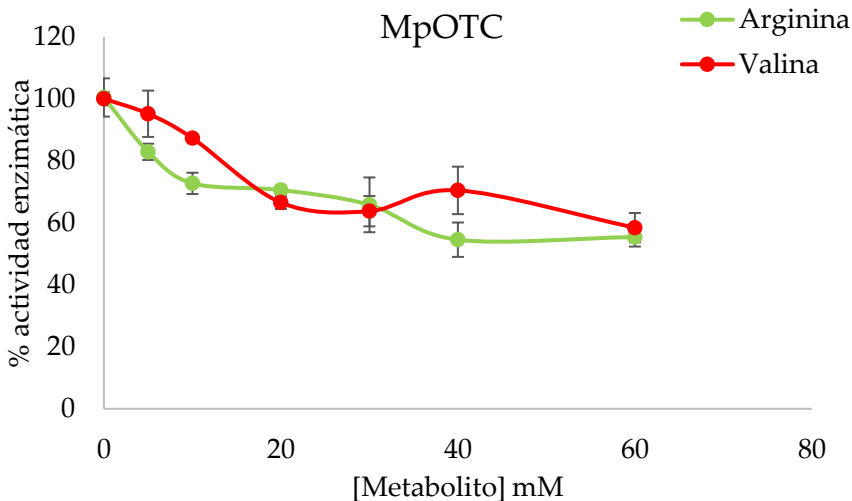


Figura R21. Disminución de la actividad enzimática de la proteína recombinante OTC de *M. polymorpha*. La actividad específica equivalente al 100 % es 7.48 ± 0.46 nkat/ μ g. La máxima reducción de la actividad se observa a 60 mM tanto para arginina como valina, con valores de 55 % y 58 % respectivamente. Las condiciones del ensayo fueron 3 mM ornitina, 10 mM CBP, Tris 50 mM, pH = 8 y 5 min de incubación de la reacción.

Resultados.

Por otro lado, la OTC de *A. thaliana* no presenta tanta sensibilidad a la valina como la de *P. pinaster*, pues la reducción máxima de actividad enzimática en presencia de este metabolito sólo se reduce un 17 %, mientras que, en presencia de arginina, la actividad se reduce un 45 %.

El caso de la OTC de *M. polymorpha* difiere de los observado en las enzimas anteriores, ya que se observa que la arginina juega un papel de mayor importancia en la reducción de actividad a concentraciones bajas, mientras que aumentar la concentración de cualquiera de los metabolitos no supone un cambio drástico en la disminución de la actividad enzimática, hasta alcanzar ambos metabolitos un valor similar de reducción de la actividad (45 % arginina y 42 % valina).

Dada la particular sensibilidad de la OTC de *P. pinaster* hacia la arginina, se decidió abordar una caracterización más profunda de esta inhibición enzimática. Para ello se tomaron diferentes concentraciones de sustrato (ornitina) para la reacción, junto a diferentes concentraciones del metabolito inhibidor (arginina) para ver cómo varían tanto K_m como $V_{m\acute{a}x}$.

En la figura R22 se puede observar como a mayor concentración de arginina, la $V_{m\acute{a}x}$ desciende hasta un 56 % (0.57 vs 0.25) en presencia de 20 mM de arginina. La reducción de la $V_{m\acute{a}x}$ implica una reducción de la $S_{0.5}$, pero es una reducción aparente, ya que al tener menor $V_{m\acute{a}x}$, también se reduce $V_{m\acute{a}x}/2$, pero ello no implica una ganancia de afinidad por el sustrato en presencia de 20 mM de arginina.

Resultados.

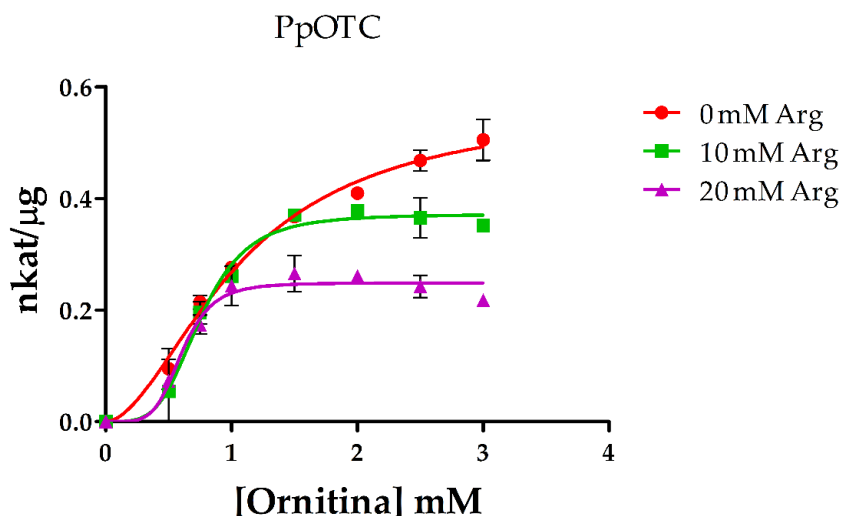


Figura R22. Inhibición alostérica de la enzima OTC de *P. pinaster* por arginina. La figura muestra cómo la presencia de arginina modifica la actividad, reduciendo la $V_{\text{máx}}$. Valores: 0 mM Arg: $S_{0.5} = 1.12 \pm 0.23$ mM, $V_{\text{máx}} = 0.57 \pm 0.05$ nkat/ μg ; 10 mM Arg: $S_{0.5} = 0.76 \pm 0.03$ mM, $V_{\text{máx}} = 0.37 \pm 0.01$ nkat/ μg ; 20 mM Arg: $S_{0.5} = 0.61 \pm 0.04$ mM, $V_{\text{máx}} = 0.25 \pm 0.01$ nkat/ μg .

Paralelamente se abordaron estudios centrados en las enzimas PpASSY y PpASL, sensibles a arginina en el caso de PpASSY, y a espermina y espermidina en el caso de PpASL (Figuras R23 y R24).

Para la enzima PpASSY, se observó una reducción de la actividad de un 27 % en presencia de 1 mM de arginina (Figura 23). El incremento de la concentración de arginina no generó mayores niveles de inhibición. En el caso de PpASL, la actividad continúa reduciéndose a medida que aumenta la concentración de espermina y espermidina, acercándose a la inhibición completa en presencia de 50 mM de espermina.

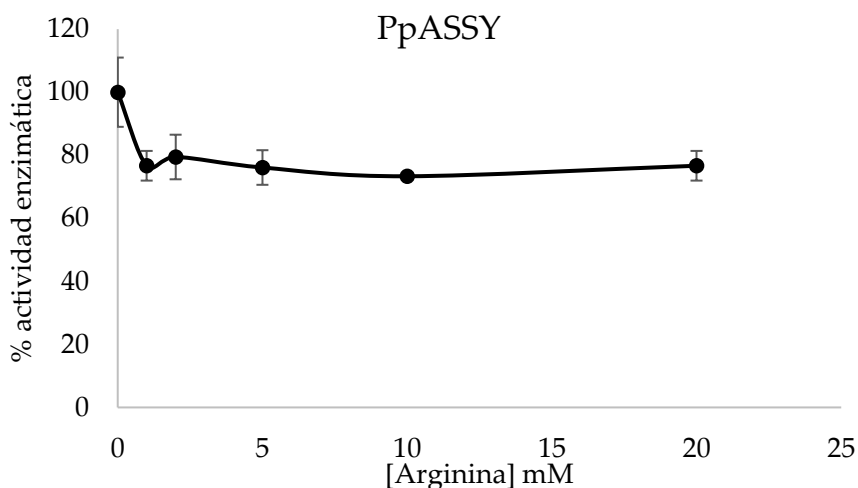


Figura R23. Reducción de la actividad enzimática de la enzima ASSY de *P. pinaster* en presencia de arginina. La actividad se reduce en hasta un 27 % respecto al control (100 % vs 73 %) cuando la arginina está presente durante la reacción enzimática. 100 % = 5.19 ± 1.64 nkat/ μ g. Las condiciones del ensayo fueron 2 mM citrulina, 2 mM aspartato, 3 mM ATP, 10 mM MgCl₂, Tris 50 mM, pH= 8.

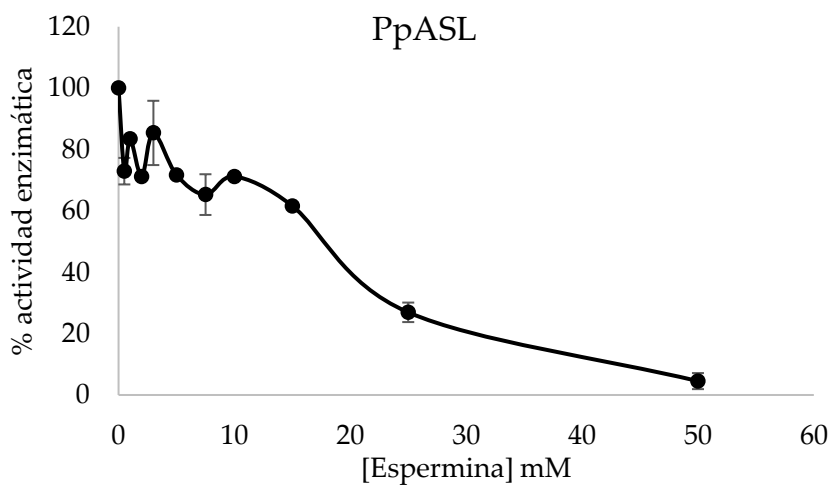


Figura R24. Disminución de la actividad enzimática de la proteína recombinante ASL de *P. pinaster*. La actividad específica equivalente al 100 % es 254.48 ± 6.36 nkat/ μ g. La máxima reducción de la actividad se observa a 50 mM con un valor de 4.53 ± 2.61 %. Las condiciones del ensayo fueron 1mM argininosuccinato y Tris 50 mM, pH = 8.

Resultados.

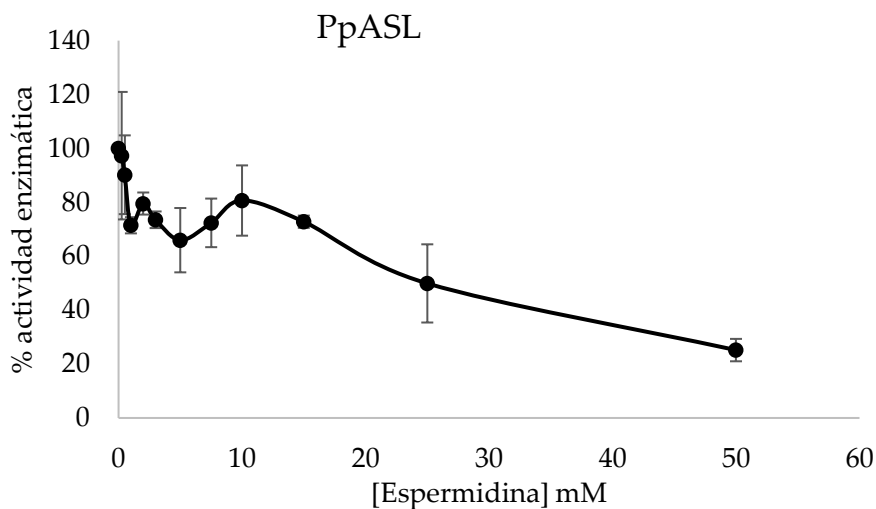


Figura R25. Disminución de la actividad enzimática de la proteína recombinante ASL de *P. pinaster*. La actividad específica equivalente al 100 % es 146.96 ± 6.92 nkat/ μ g. La máxima reducción de la actividad se observa a 50 mM con un valor de 25.18 ± 4.16 %. Las condiciones del ensayo fueron 1 mM argininosuccinato y Tris 50 mM, pH = 8.

De forma resumida, en la siguiente tabla se presentan valores de IC50 para diferentes enzimas en presencia de compuestos con actividad inhibitoria.

Enzima	Compuesto	IC50 (mM)
PpOTC	arginina	10.28
	valina	7.19
AtOTC	arginina	4.54
	valina	8.31
MpOTC	arginina	7.95
	valina	13.09
PpASSY	arginina	1.94
PpASL	espermina	19.24
	espermidina	4.97

Tabla R6. Valores de IC50 para diferentes enzimas en presencia de compuestos con actividad inhibitoria.

7. Estudio de líneas mutantes para los genes *otc*, *assy* y *asl* en *Arabidopsis thaliana*.

Uno de los objetivos experimentales de este trabajo de tesis incluía la caracterización de líneas mutantes para los genes codificantes para las enzimas OTC, ASSY y ASL. Como se ha descrito anteriormente, dichos genes son de copia única. Mediante estos estudios se pretendía determinar la posibilidad de aislar plantas mutantes homocigotas para cada uno de los tres genes, con el fin de determinar la esencialidad de estas enzimas o la posibilidad de rutas alternativas de biosíntesis de arginina y compuestos derivados.

Para abordar este objetivo se obtuvieron semillas procedentes de las colecciones SALK (SALK_099780, SALK_145430, SALK_137921) Gabi-KAT (268C05, 149C10) y Saskatchewan (SK_439), conservadas en el Centro de Almacenaje de Arabidopsis de Nottingham (NASC por sus siglas en inglés).

Una vez aisladas plantas heterocigotas para cada línea, se procedió a la recolección de semillas producidas por autofecundación y a su siembra.

Tras realizar las reacciones de PCR sobre el material genético extraído de las diferentes líneas mutantes, se obtienen los siguientes productos, que permitirá determinar si un individuo de la línea mutante es tipo silvestre (wt), heterocigoto u homocigoto.

Resultados.

- Línea Gabi-Kat 268C05 (*Atotc*):

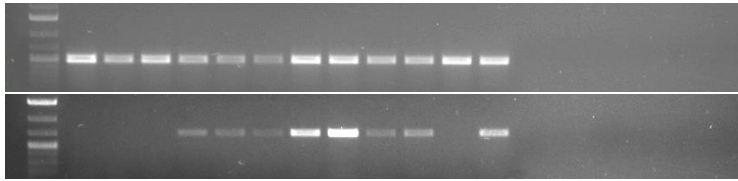


Figura R26. Imagen de los productos de PCR obtenidos para individuos de la línea Gabi-Kat 268C05. La parte superior corresponde a la reacción de PCR FW+RV (amplificación región no mutada del gen), la parte inferior a la reacción RV+LB (amplificación región mutada del gen por inserción del T-DNA).

- Línea SALK 099780 (*Atotc*):

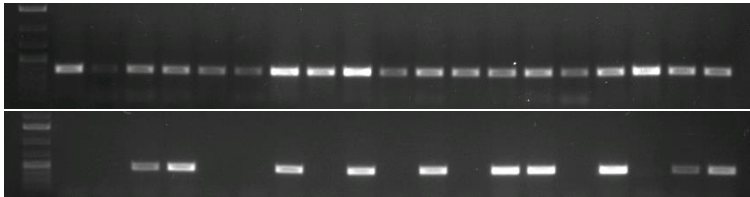


Figura R27. Imagen de los productos de PCR obtenidos para individuos de la línea SALK 099780. La parte superior corresponde a la reacción de PCR FW+RV (amplificación región no mutada del gen), la parte inferior a la reacción FW+LB (amplificación región mutada del gen por inserción del T-DNA).

- Línea SALK 145430 (*Atassy*):

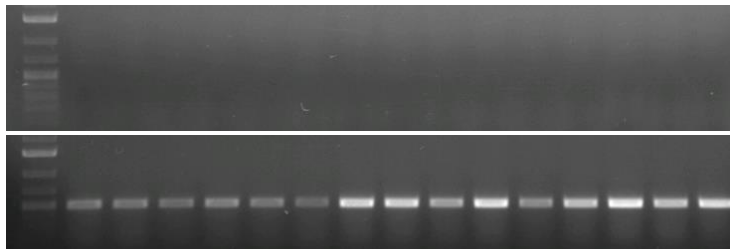


Figura R28. Imagen de los productos de PCR obtenidos para individuos de la línea SALK 145430. La parte superior corresponde a la reacción de PCR FW+RV (amplificación región no mutada del gen), la parte inferior a la reacción RV+LB (amplificación región mutada del gen por inserción del T-DNA).

- Línea SALK 137921 (*Atassy*):

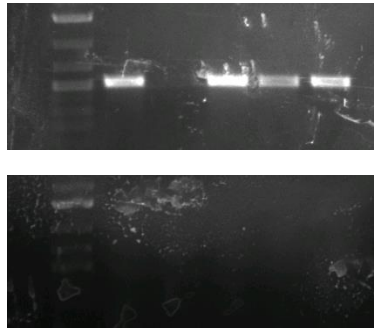


Figura R29. Imagen de los productos de PCR obtenidos para individuos de la línea SALK 137921. La parte superior corresponde a la reacción de PCR FW+RV (amplificación región no mutada del gen), la parte inferior a la reacción FW+LB, tampoco se obtuvo producto de PCR para la reacción RV+LB (amplificación región mutada del gen por inserción del T-DNA).

- Línea Gabi-Kat 149C10 (*Atasl*):

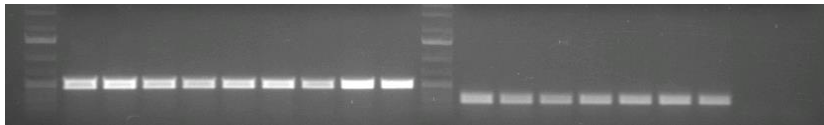


Figura R30. Imagen de los productos de PCR obtenidos para individuos de la línea Gabi-Kat 149C10. La parte izquierda del patrón central corresponde a la reacción de PCR FW+RV (amplificación región no mutada del gen), la parte derecha a la reacción FW+LB (amplificación región mutada del gen por inserción del T-DNA).

- Línea SK 439 (*Atasl*):

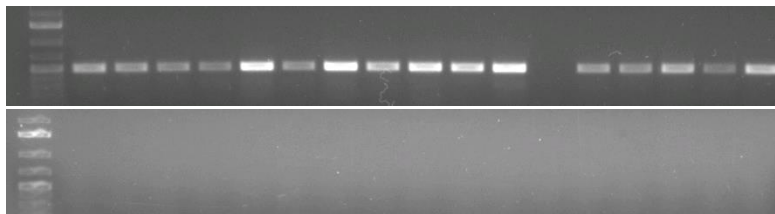


Figura R31. Imagen de los productos de PCR obtenidos para individuos de la línea Gabi-Kat 149C10. La parte superior corresponde a la reacción de PCR FW+RV (amplificación región no mutada del gen), la parte inferior a la reacción FW+LB, tampoco se obtuvo producto de PCR para la reacción RV+LB (amplificación región mutada del gen por inserción del T-DNA).

Resultados.

De acuerdo con una segregación mendeliana, se esperaría obtener un 25 % de plantas homocigotas para la mutación. Sin embargo, sólo se ha podido obtener una descendencia homocigota en una de las líneas (SALK 145430), mientras que el resto de líneas únicamente han producido individuos wt o heterocigotos, en diferentes porcentajes.

Para las dos líneas mutantes de *Atotc* sólo se pueden obtener individuos wt o heterocigotos para la mutación (figuras R26 y R27). Para las líneas mutantes de *Atassy* se obtienen individuos homocigotos para la mutación en la línea SALK 145430 (figura R28), sin embargo, sólo se obtienen individuos wt en la línea SALK 137921 (figura R29). Para las líneas mutantes de *Atasl* se obtienen exclusivamente individuos heterocigotos para la mutación o wt (figuras R30 y R31).

Línea	WT	HE	HO
Gabi-Kat 268C05	142	15	--
SALK 099780	34	28	--
SALK 145430	--	--	53
SALK 137921	58	--	--
Gabi-Kat 149C10	42	47	--
SK 439	67	--	--

Tabla R7. Número de individuos analizados y su correspondencia a cada grupo en cada línea mutante. WT = genotipo silvestre; HE = genotipo heterocigoto; HO = genotipo homocigoto.

Se analizó la producción de semillas de algunas líneas, observándose huecos en la distribución de las semillas en el interior de la silicua, indicando que faltaban semillas en comparación con las silicuas de los individuos wt, lo que podría indicar la no viabilidad de las semillas o embriones con genotipo homocigoto para la inserción.

- Línea wt (Columbia-0):



Figura R32. Imagen del interior de una silicua procedente de una planta Columbia-0 (wt) donde se puede ver la distribución y número de semillas habitual en una silicua.

- Línea Gabi-Kat 268C05 (*Atotc*):



Figura R33. Imagen del interior de una silicua procedente de un individuo heterocigoto para la inserción en la línea Gabi-Kat 268C05, donde se puede ver la distribución y cantidad de semillas, y la ausencia de algunas a lo largo de la silicua, comparando con la línea wt.

Resultados.

- Línea SALK 145430 (*Atassy*):



Figura R34. Imagen del interior de varias silicuas procedentes de un individuo homocigoto para la inserción en la línea SALK 145430, donde se puede ver la distribución y cantidad de semillas, donde apenas faltan semillas en comparación con la línea wt.

- Línea Gabi-Kat 149C10 (*Atasl*):



Figura R35. Imagen del interior de una silicua procedente de un individuo heterocigoto para la inserción en la línea Gabi-Kat 149C10, donde se puede ver la distribución y cantidad de semillas, y la ausencia de algunas a lo largo de la silicua, en comparación con la línea wt.

Resultados.

Dado que la línea SALK 145430 parecía presentar cierta discrepancia entre presencia de la inserción de mutagénesis (Figura R28) y la producción de semillas (Figura R34), pues la presencia de la mutación debería crear una disrupción en el gen y hacer los organismos homocigotos inviables. Se decidió proseguir en el estudio de la línea, y para ello se realizó una extracción de RNA y se midieron los niveles de expresión relativa de este gen en una serie de individuos homocigotos para la inserción.

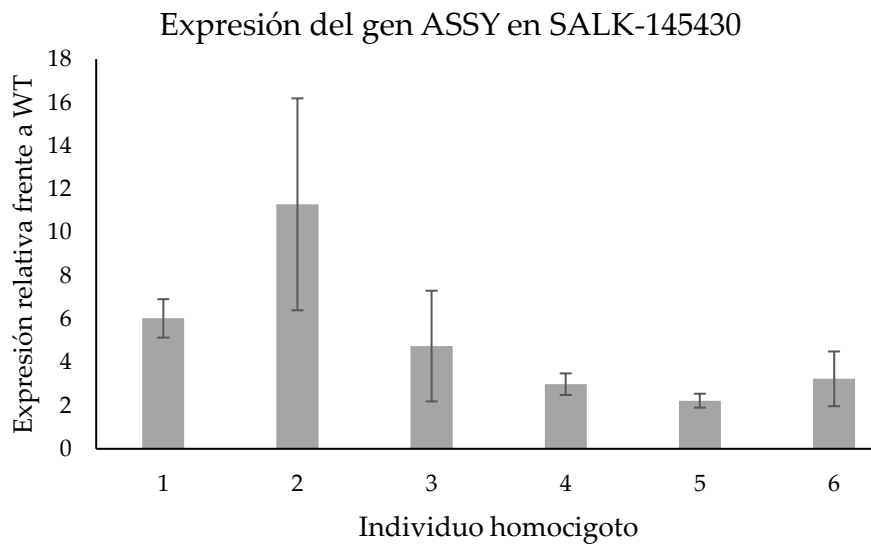


Figura R36. Gráfico de niveles de expresión de las diferentes plantas homocigotas de la línea SALK 145430 para la mutación pero que presentan semillas en número similar a wt.

No se observa la disminución esperada en los niveles de expresión de este gen respecto a la línea wt, e incluso aumenta considerablemente en algunos individuos.

Discusión

Una primera visión general de los resultados presentados en este trabajo de tesis pone de manifiesto la importancia de estas enzimas para el desarrollo de las plantas, pues se expresan en todos los tejidos de los que se disponen datos, el análisis de los mutantes demuestran que no existe una alternativa para la función de estos genes y la caracterización de estructuras tridimensionales con dominios enzimáticos similares indican una presión evolutiva conservadora para estas proteínas.

1. Búsqueda e identificación de los genes codificantes para las enzimas OTC, ASSY y ASL.

Todos los genes codificantes para las enzimas OTC, ASSY y ASL fueron encontrados en copia única en las bases de datos de los organismos *Pinus pinaster*, *Arabidopsis thaliana* y *Marchantia polymorpha*. Los genes de copia única se caracterizan por presentar un elevado grado de conservación de sus secuencias génicas entre diferentes especies y constituyen una fuente ideal para la generación de marcadores moleculares para estudiar la diferenciación de linajes en plantas (Li et al., 2017). Sin embargo, cabe destacar que en el caso de *Physcomitrium patens* se han encontrado hasta dos copias de los genes que codifican para las enzimas OTC y ASSY. Esto podría deberse a las duplicaciones que ha sufrido el genoma de *P. patens*, pues ocurre de forma habitual en musgos, pero no en el resto de briófitos (hepáticas y antoceros) (Lang et al., 2018). Independientemente, en el caso de las OTC de *P. patens*, sólo uno de los genes pudo ser clonado a partir de preparaciones de RNA procedentes de tejido vegetativo, el correspondiente al código OTC_1 (Tabla R1), a pesar de que ambos (OTC_1 y OTC_2) presentan niveles

Discusión.

de expresión de RNA mensajero altos en los diferentes tejidos de este organismo, como se puede observar en los atlas de expresión de *P. patens* (Figura R4).

Resultados similares se encontraron en el caso de la enzima ASSY. En *P. pinaster*, *A. thaliana* y *M. polymorpha* el gen que codifica para la enzima se encuentra en copia única, mientras que en caso de *P. patens* existen al menos dos genes que podrían dar lugar a la enzima ASSY. Sin embargo, no se ha conseguido clonar ninguno de los CDS a partir de las preparaciones de RNA, como se puede ver en la Figura D1.

Por último, para el gen que codifica para la enzima ASL sólo presenta una copia en todos los organismos estudiados, incluido *P. patens*. En este último caso, tampoco fue posible clonar el CDS completo. Los fragmentos clonados carecían de la región codificante para uno de los dominios importantes del centro catalítico (Figura D2), que, como se ha visto en las estructuras tridimensionales, es fundamental para construir el homotetrámero funcional.

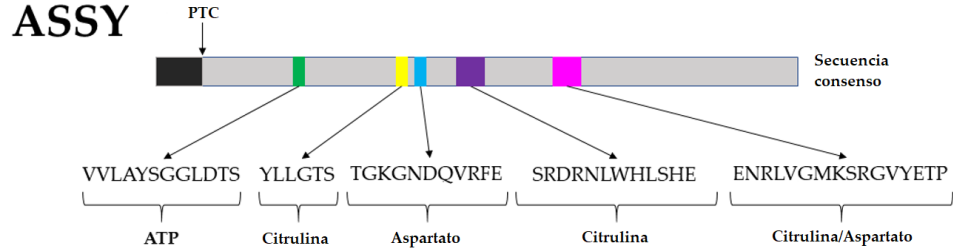
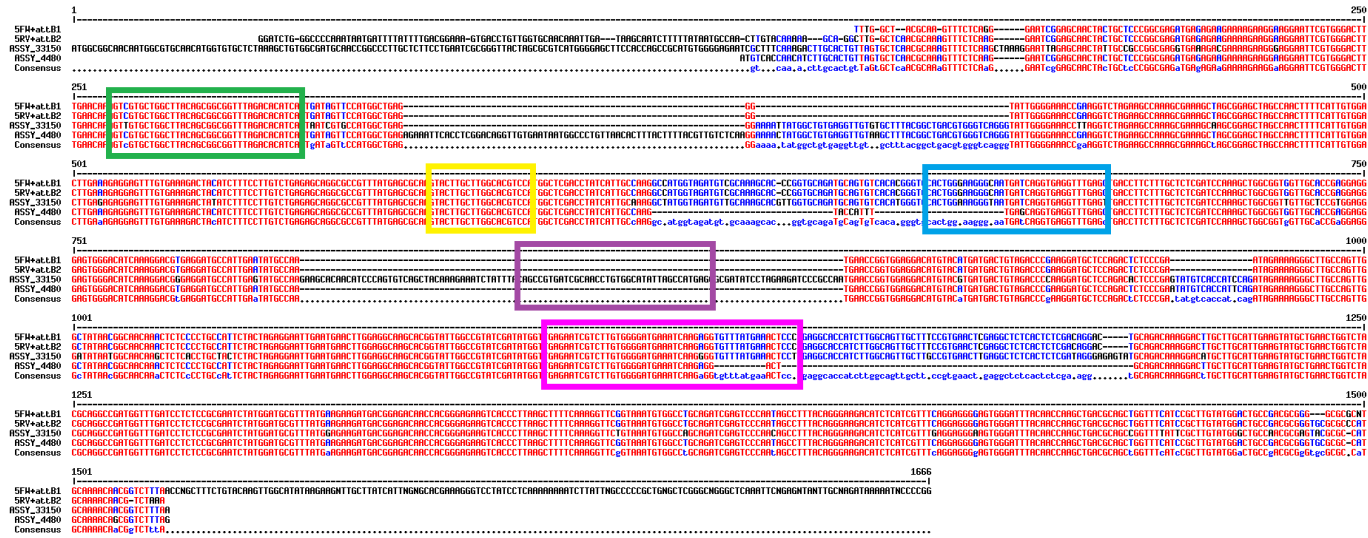


Figura D1. Alineamiento de las secuenciaci3n “Forward” y “Reverse” de uno de los fragmentos de cDNA clonados a partir de preparaci3n de RNA codificante para ASSY en *P. patens*. Se observa la ausencia de regiones en los fragmentos clonados (1ª y 2ª l3neas). Los recuadros indican los dominios que son fundamentales para la actividad enzimática de la prote3na, manteniendo el c3digo de colores.

Discusión.

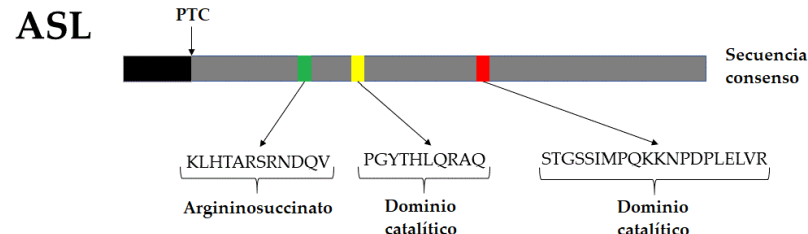


Figura D2. Alineamiento del gen Pp3c18_13220 procedente de la base de datos Phytozome y mejor candidato a codificar una enzima ASL funcional (1ª línea) en *P. patens*, secuenciaciones “Forward” y “Reverse” de uno de los fragmentos de cDNA clonados a partir de preparaciones de RNA (2ª y 3ª líneas). La 4ª línea corresponde al consenso del alineamiento. Los recuadros indican los dominios que son fundamentales para la actividad enzimática de la proteína, manteniendo el código de colores.

2. Niveles de expresión de los genes correspondientes a las enzimas OTC, ASSY y ASL en diferentes organismos y tejidos.

Se observa que, para la mayoría de los organismos, hay una tendencia a expresar en mayor cantidad el gen de la enzima ASSY, y en menor el gen de la enzima ASL, excepto en el caso de *Pinus pinaster*, que mantiene unos niveles similares para las tres enzimas (Tabla R2, Figura R1).

En el caso de *P. pinaster*, los genes *Ppotc*, *Ppassy* y *Ppasl* presentan altos niveles de expresión en los meristemos apical y radicular, tejidos de mucha actividad celular por su función de desarrollo, lo que concordaría con una mayor producción de arginina y sus derivados en esos tejidos. Particularmente para el gen *Ppotc* se observa una caída en los niveles de expresión en el mesófilo de las acículas jóvenes con respecto a las acículas emergentes, aunque se mantienen esos niveles en la región vascular de las mismas acículas.

De forma muy interesante, el patrón de expresión en las acículas jóvenes se repite en todas las enzimas anteriores en la ruta, como se muestra a continuación (Figura D3). Sin embargo, cambia para *Ppassy* y de nuevo aparece en *Ppasl* (Figura R1).

Discusión.

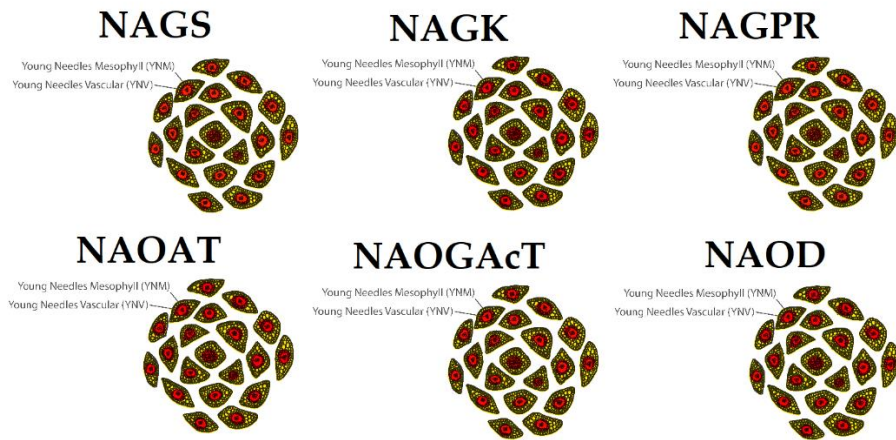


Figura D3. Patrón de expresión en acículas de plántulas jóvenes de los genes que codifican para las diferentes enzimas que intervienen antes que la OTC en la ruta.

Posiblemente se deba a que es un estado de desarrollo dependiente nutricionalmente de tejidos anteriores maduros, y que la síntesis de arginina sea una ruta metabólica que se pone en marcha una vez los tejidos están ya definidos.

Sin embargo, en el caso de *A. thaliana*, *Atotc*, *Atassy* y *Atasl* presentan un patrón de expresión particularmente alto en la semilla 24 h después de ser embebida. Esto ocurre de forma similar en *P. pinaster*, donde los niveles de expresión para estos genes durante la germinación son altos al principio, y posteriormente van decayendo (Llebrés et al., 2018), e igualmente se observa durante la germinación de la espora en *M. polymorpha* (Figura R3). Aunque no se poseen datos para la germinación de las esporas de *P. patens*, sí que se observa una alta expresión de los genes *Ppatassy* y *Ppatasl* en la espora (Figura R4), y algo menor en el caso de los genes *Ppatotc* 1 y 2 (Figura R4). También destacan los niveles de expresión de los genes *Ppasl* y *Ppatasl*, que no mantienen los niveles altos

Discusión.

que se esperarían, si mantuviesen el patrón de expresión que siguen los genes que preceden en la ruta en algunos tejidos, como la raíz en *P. pinaster* (Figura R1) y el caulonema y gametofito en *P. patens* (Figura R4).

Con todo ello, parece que la expresión de estos genes no estaría determinada por el estado de desarrollo del tejido en cuestión, y posiblemente sean otros factores los que determinen cuando y a qué nivel se expresan estos genes. Probablemente la biosíntesis de arginina ocurra principalmente en los tejidos en los que todos los genes tienen altos niveles de expresión. Por otro lado, la semilla germinante no es un tejido que requiera síntesis de arginina, pues durante la hidrólisis de las proteínas de reserva, se liberan grandes cantidades de este aminoácido que puede ser degradado para recuperar el nitrógeno almacenado en su estructura molecular o bien usado directamente como aminoácido.

Las especies *P. pinaster* y *A. thaliana* difieren en su patrón de acumulación de proteínas de reserva, siendo mucho menores en la segunda. Este hecho podría estar asociado con la pronta expresión de los genes de la ruta en *A. thaliana* cuando comienza la germinación como se ve en los paneles 1 y 2 (Figura R2). Los datos de expresión son compatibles con un proceso similar que sucede en *M. polymorpha* y *P. patens*, que, aunque la espora acumula unas proteínas de reserva particulares, no lo hacen en gran cantidad y por ello necesitarían activar los genes de biosíntesis de arginina.

Discusión.

3. Estructura tridimensional de las proteínas OTC, ASSY y ASL.

Las secuencias de nucleótidos fueron traducidas a aminoácidos en el servicio web de Expasy (Expasy/translate). Se determinó la secuencia del péptido de tránsito al cloroplasto (ptc) en el servicio web TargetP (opción: Plant) (TargetP.dk). Las secuencias de aminoácidos sin ptc fueron alineadas entre los cuatro organismos analizados, y se determinaron los dominios que configuran el centro activo de las enzimas, en base a los datos disponibles tanto en Uniprot (Uniprot.org) como en RCSB PDB (rcsb.org) y se compararon con las secuencias de animales (Figura R5).

Las enzimas OTC de plantas presentan varias modificaciones en los residuos que determinan el centro activo. En la región que une ornitina y carbamoil-P, el residuo de treonina (dominio STRTR) que aparece en el consenso de las secuencias animales se cambia por una metionina en las secuencias de plantas (dominio SMRTR), lo cual parece ser un cambio importante, pues se sustituye un grupo hidroxilo por uno apolar, aunque la presencia de metionina hace más susceptible a las enzimas OTC de plantas de oxidarse, por el azufre de su cadena lateral, y presumiblemente inactivar su centro activo. Además de que se pierde una carga negativa de las dos que presenta la enzima en animales.

En el mismo dominio, pero en una región distante, hay otra sustitución de una isoleucina por una cisteína en las secuencias de plantas, con lo cual se sustituye por un grupo reactivo -SH. Ello aumenta la cantidad de residuos con carga que intervienen en la conformación del centro activo. El resto de sustituciones en los otros dos dominios ocurren entre

Discusión.

aminoácidos sin carga, pero sí que reducen las cadenas laterales, pasando de isoleucina y treonina a alanina y valina respectivamente, lo cual sugiere una mayor flexibilidad en estas regiones.

En el caso de las enzimas ASSY, la mayoría de los cambios se encuentran en el cuarto dominio, donde se une citrulina, y que alberga cambios significativos entre la secuencia consenso de animales y plantas. En primer lugar, se encuentra una sustitución de metionina por arginina, lo cual añade una carga positiva al centro activo. Seguidamente se observa otra sustitución de glutamato por arginina también, lo que implica un cambio de cargas, la negativa del glutamato por otra positiva de la arginina. El tercer cambio de este dominio ocurre por la sustitución de otra metionina por un triptófano. Este cambio no aporta diferencias de cargas en el dominio, pero sí que, al ser un aminoácido de cadena lateral tan grande, podría reducir la flexibilidad del centro activo. El cuarto cambio de este dominio sustituye un residuo de isoleucina en la secuencia de animales por una leucina en plantas, lo cual no es muy significativo, más allá de ser un residuo más pequeño. El quinto y último cambio de este dominio es una tirosina de la secuencia de animales que se cambia por una histidina, con lo cual se sustituye una carga negativa por un aminoácido sin carga, pero que mantiene una estructura de cadena lateral parecida. En resumen, estos cambios aportan dos cargas positivas al dominio, las de las dos argininas, y se pierden las dos cargas negativas que aportaban tanto glutamato como tirosina. El último dominio de la enzima presenta únicamente 3 cambios, una fenilalanina por una leucina y dos isoleucinas por valinas. Estos cambios no implican modificación de cargas del dominio, pero sí

Discusión.

que se reducen las cadenas laterales, permitiendo posiblemente una mayor flexibilidad del dominio. Es importante destacar respecto a las enzimas ASSY de plantas que en ninguno de los tres primeros dominios varía su secuencia respecto a las de animales, lo que sugiere una alta presión evolutiva sobre estas regiones en particular.

Por último, la enzima ASL presenta pocos cambios entre los dos grupos de organismos, una glicina por una alanina en el primer dominio, una leucina por una isoleucina en el tercer dominio, y el cambio que quizás podría ser más relevante, también en el tercer dominio, es una serina por una prolina, donde se pierde la carga negativa que aporta la serina, además del cambio de rigidez que aportaría la prolina a la estructura tridimensional.

4. Cálculo de las masas moleculares de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *Pinus pinaster*.

A partir de alícuotas purificadas de las proteínas recombinantes se calcularon las masas moleculares de los multímeros de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *P. pinaster*.

Para la OTC el multímero es un homotrímero, resultado que concuerda con los multímeros estudiados tanto para la OTC en animales (Marshall et al., 1972; Bellocco et al., 2002; Tsuji, 1983; Pierson et al., 1977) como en resultados previos obtenidos en plantas (Lee et al., 2000; Lee et al., 1998; Slocum et al., 1991; Bellocco et al., 2002). Aunque en el caso de bacterias se han llegado a cristalizar estructuras con más monómeros (Sankaranarayanan et al., 2007; Baugh et al., 2013) que podrían

Discusión.

corresponder con agrupamientos de trímeros, que representaría la unidad funcional.

La proteína ASSY también conforma un multímero, en este caso un tetrámero. Hay muy pocas estructuras cristalografiadas, principalmente de bacterias (Goto et al., 2003) y humano (Karlberg et al., 2008) que sí presentan una organización tetramérica de los monómeros, al igual que la ASSY de *P. pinaster*. Igualmente, aunque sin cristalizar, también se han identificado tetrámeros en *Bos taurus* (Ratner, 1973) y *Sus scrofa* (Wakui et al., 1992). En el caso de *S. scrofa*, se describe la enzima como una pareja de dímeros, hecho que podría ser viable, dado que cada monómero conforma su propio centro activo, aunque igualmente se agrupan 4 monómeros, por lo que probablemente se requieran de los 4 monómeros para que la enzima sea funcional.

Para la ASL, todos los organismos estudiados presentan una estructura de homotetrámero, como son *Anas platyrhynchos* (Sampaleanu et al., 2004), *Homo sapiens* (Yu et al., 2000) y *Bos taurus* (Lusty et al., 1972), a excepción de *Chlamydomonas reinhardtii*, que presenta una estructura pentamérica (Matagne et al., 1977). *P. pinaster* mantiene esta estructura oligomérica en forma de homotetrámero, como se observa en los resultados (Figura R12), dado que cuando la proteína se pliega y adquiere su conformación tridimensional, los dominios que interviene en el centro activo están muy alejados entre sí, y sólo cuando se reúnen los 4 monómeros se generan los 4 centros activos para que la enzima sea funcional.

Discusión.

5. Parámetros cinéticos de las proteínas OTC, ASSY y ASL de *Pinus pinaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens*.

Los resultados de esta tesis ponen de manifiesto la existencia de grandes variaciones en los parámetros cinéticos entre las enzimas OTC, ASSY y ASL de las especies analizadas. Esta observación contrasta fuertemente con el elevado grado de conservación de los residuos en los centros activos (Figuras D4, D5, D6), con la excepción de un cambio puntual de una leucina (L) por isoleucina (I) en la enzima ASSY de *P. patens*. En conjunto, se hace explícito que la eficiencia a la hora de metabolizar compuestos no depende únicamente de la secuencia del centro activo.

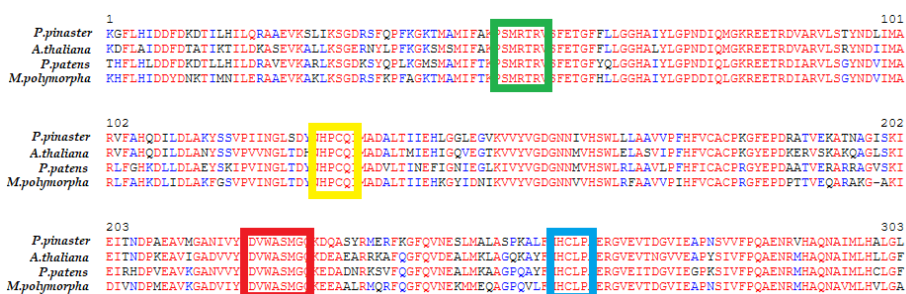


Figura D4. Secuencias de aminoácidos de las proteínas OTC con los dominios destacados, siguiendo el código de colores de la figura R5.



Figura D5. Secuencias de aminoácidos de las proteínas ASSY con los dominios destacados, siguiendo el código de colores de la figura R5.

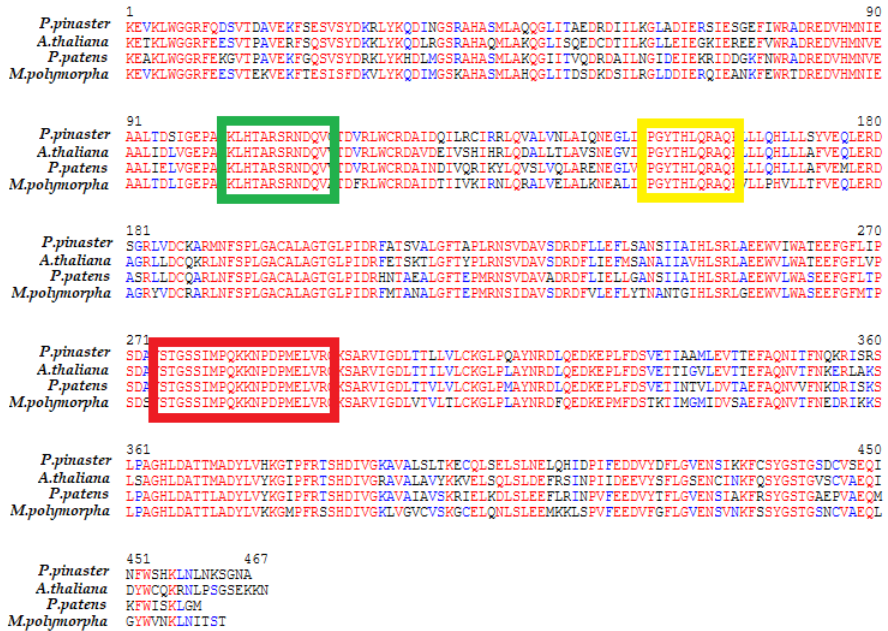


Figura D6. Secuencias de aminoácidos de las proteínas ASL con los dominios destacados, siguiendo el código de colores de la figura R5.

La enzima con mayor actividad dentro del grupo de las OTC es la de *M. polymorpha* (MpOTC) ($K_{cat} = 56.2 \text{ s}^{-1}$), siendo la OTC de *P. patens* (PpatOTC) la que presenta menor actividad ($K_{cat} = 6.27 \text{ s}^{-1}$) (Tabla R3). Por otro lado, las enzimas con mayor afinidad para ambos sustratos son las de *A. thaliana* y *M. polymorpha*. Todas las enzimas presentan regulación alostérica, pues presentan un índice de Hill (nH) por encima de 1, principalmente para la ornitina, pues parece ser el sustrato inductor del cambio conformacional en los monómeros. Los valores obtenidos de K_m para ornitina y K_{cat} están dentro del rango de valores obtenidos para esta enzima en otros organismos, como en *Bos taurus* ($K_{cat} = 187 \text{ s}^{-1}$) (Marshall et al., 1972) o *Alnus glutinosa* ($K_{cat} = 18 \text{ s}^{-1}$) (Martin et al., 1983). Los valores de K_m para carbamoil-P también están entre los valores obtenidos para otras especies, como *Piaractus mesopotamicus* (K_m

Discusión.

= 0.0008 mM) (Monzani et al., 2008) y *Moritella abyssii* ($K_m = 1.1$ mM) (Xu et al., 2003), sin embargo, el valor de K_m para *P. pinaster* es mucho más alto que los que aparecen en la bibliografía ($K_m = 3.48$ mM). Dado que las enzimas no presentan un comportamiento cinético de Michaelis-Menten por tener regulación alostérica, no se puede calcular una K_m al uso, pero considerando el valor de $S_{0.5}$, podemos ver que la afinidad por la ornitina también es alta en estos organismos, pues los valores hallados en la bibliografía se mueven en el rango entre 0.001 mM en *P. mesopotamicus* (Monzani et al., 2008) y 45 mM en *Moritella abyssii* (Xu et al., 2003). Comparando con otras especies vegetales en la bibliografía, estas enzimas presentan una afinidad por ornitina similar a *Spinacea oleracea* ($K_m = 0.19$ mM) (Bellocco et al., 2002) pero mucho mayor que en los casos de *Sacharum officinarum* ($K_m = 3.11$ mM) (Glenn et al., 1977) o *Canavalia lineata* ($K_m = 2.4$ mM) (Lee et al., 1997). Sin embargo, la afinidad por carbamoil-P sí que es más baja en las enzimas estudiadas aquí, destacando sobre todo la baja afinidad de la OTC de *P. pinaster* ($K_m = 3.48$ mM) (Tabla R3). En el caso de *S. officinarum* se describe una OTC mitocondrial que presenta parámetros cinéticos similares a las enzimas OTC cloroplastidiales aquí analizadas y de *S. oleracea*, y otra citoplasmática, pero no así cloroplastídica.

Dentro del grupo de las enzimas ASSY estudiadas, la enzima que mayor actividad presenta es la de *A. thaliana* (AtASSY) ($K_{cat} = 105.62$ s⁻¹), mientras que es la de *P. pinaster* (PpASSY) la que menos ($K_{cat} = 2.82$ s⁻¹) (Tabla R4). Los valores de K_m , sin embargo, son bastantes similares entre ambas enzimas, y ligeramente superiores para MpASSY, si aproximamos desde los valores de $S_{0.5}$. y también se mantienen similares

Discusión.

entre ambos sustratos. Cabe destacar que las enzimas PpASSY y AtASSY presentan una cinética de tipo Michaelis-Menten, mientras que MpASSY presenta regulación alostérica, bastante fuerte con un índice de Hill para ambos sustratos (citrulina y aspartato) por encima de 3. En la literatura no aparecen muchos estudios sobre esta enzima en plantas, sólo para *Daucus carota* (Cruz et al., 2007) y *Pisum sativum* (Shargool, 1971), pero sólo se aportan valores de actividad específica, por lo que no se puede comparar la afinidad de las enzimas aquí estudiadas con las de otras plantas, sólo con las procedentes de mamíferos como *Homo sapiens* ($K_m = 0.03$ mM citrulina; $K_m = 0.029$ mM aspartato) (Matsuda et al., 1979), *Bos taurus* ($K_m = 0.02$ mM citrulina; $K_m = 0.035$ mM aspartato) (Rochovansky et al., 1977; Ratner, 1973) o *Mus musculus* ($K_m = 0.36$ mM citrulina; $K_m = 0.18$ mM aspartato) (Guerreiro et al., 2009). En todos los casos, las afinidades por ambos sustratos se mueven en valores similares, siendo las enzimas estudiadas en mamíferos más afines que las de plantas. Es muy destacable la diferencia de actividad específica entre AtASSY ($V_{max} = 2.09$ nkat/ μ g) y las otras enzimas estudiadas, pues es hasta 10 veces superior que MpASSY ($V_{max} = 0.23$ nkat/ μ g) y casi 30 veces superior que PpASSY ($V_{max} = 0.07$ nkat/ μ g), diferencia que no se observaba en las OTC procedentes de los mismos organismos. La actividad de estas enzimas no ocurre en ausencia de un catión divalente, principalmente Mg^{2+} (Chapman, 1986).

Las enzimas ASL son el grupo de enzimas que presentan más actividad específica de entre los tres, con valores de eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m) que rozan la "perfección catalítica" (Tabla 6-8, Lehninger's Principles of Biochemistry 4th Edition, 2004) como es el caso de AtASL, con un valor

Discusión.

de $K_{cat}/K_m = 5.07 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Tabla R5). Todas presentan una cinética de tipo Michaelis-Menten y, además, presentan una alta afinidad por el argininosuccinato, único sustrato de esta enzima (Kim et al., 1986), con valores de K_m entre 0.66 mM para MpASL, 0.26 mM para AtASL y 0.22 mM para PpASL (Tabla R4), en el rango de valores descritos en la literatura para *Canavalia ensiformis* ($K_m = 0.13 \text{ mM}$) (Rosenthal et al., 1969) o *Chlamydomonas reinhardtii* ($K_m = 0.26 \text{ mM}$) (Farrel et al., (1987)), mientras que para animales, las enzimas presentan una afinidad similar por el argininosuccinato, como se recoge en la literatura para *Anas sp.* ($K_m = 0.07 \text{ mM}$) (Tsai et al., 2005), *Bos taurus* ($K_m = 0.146 \text{ mM}$) (Bray et al., 1971) y *Homo sapiens* ($K_m = 0.1 \text{ mM}$) (Palekar et al., 1981). Aunque en esta enzima está favorecida la reacción en dirección a la síntesis de arginina, también puede ocurrir la reacción reversa, la síntesis de argininosuccinato a partir de fumarato + arginina (O'Brien et al., 1981; Tischner et al., 2007). En este trabajo no se han medidos los parámetros cinéticos para la reacción reversa, pero se comprobó que ésta ocurría, midiendo la reducción de absorbancia ($\lambda = 240 \text{ nm}$) asociada al consumo de fumarato.

En general, desde la perspectiva de las reacciones químicas *per se*, parece que la velocidad de transformación de ornitina en arginina viene delimitada por la segunda enzima, la ASSY, pues es la que presenta una menor actividad específica, excepto el caso de *A. thaliana*, donde la enzima limitante de la ruta sería la OTC. Habría que tener en cuenta qué cantidades de estas enzimas hay en las células en según qué estado fisiológico. Aun así, ambas OTC y ASSY tienen desplazado el equilibrio de la reacción hacia la formación de arginina, ya que la reacción reversa

Discusión.

difícilmente puede ocurrir, puesto que, en el caso de la OTC, se libera un grupo Pi procedente del carbamoil-P, grupo muy reactivo y que requiere de mucha energía para volver a formar ornitina desde citrulina. A pesar de ello, existen algunos microorganismos capaces de realizar la reacción reversa de la OTC, pues usan arginina como fuente de carbono para generar ATP (De Angelis et al., 2002). En el caso de la enzima ASSY, se libera un grupo pirofosfato (PPi), también altamente reactivo dentro del metabolismo celular, lo que permite que, aunque las reacciones enzimáticas de las enzimas OTC y ASSY sean “lentas” comparadas con la última enzima de la ruta, ocurran en un único sentido.

Se observa también que las enzimas de *A. thaliana* presentan altos valores de actividad específica (nkat/ μ g) y eficiencia catalítica (K_{cat}/K_m), así como alta afinidad por sus sustratos (K_m). Esta característica peculiar en este organismo podría venir motivada por la pérdida del gen de la ornitina descarboxilasa (ODC) (Hanfrey et al., 2001), ausente en las brassicaceas (Alcázar y Tiburcio, Encyclopedia of Applied Plant Sciences, 2017) y que obligaría de esta forma a canalizar todo el flujo metabólico para la síntesis de arginina, poliaminas y sus derivados, a través de la ruta de la arginina descarboxilasa (ADC), pues la alternativa citosólica (ODC) no estaría disponible en estos organismos, y ello habría influido en una mayor presión evolutiva sobre esta parte de la ruta, para hacerla más eficiente. Por ello, al comparar los datos con los otros dos organismos, que sí poseen ODC, se observa una mayor eficiencia de la ruta, en general, en *A. thaliana*. De cualquier modo, existen otros organismos, como *P. patens*, que también carecen de ODC, y que por ello se decidió investigar también en este proyecto, pero que debido a la

Discusión.

dificultad para clonar los genes que dan lugar a PpatASSY y PpatASL, aún no puede servir para sostener esta hipótesis. Determinar la presencia o no de la enzima ODC en grupos diferentes de organismos y la influencia de su ausencia en la actividad de las enzimas OTC, ASSY y ASL ayudará a completar esta hipótesis.

6. Efectos de diferentes metabolitos sobre la actividad de las enzimas recombinantes OTC, ASSY y ASL de *Pinus pinaster*, *Arabidopsis thaliana*, *Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens*.

La influencia de la arginina en la regulación de su propia biosíntesis es un hecho bien conocido desde hace tiempo (Ferrario-Mery et al., 2006; Beez et al., 2009; Llebrés et al., 2020). Este aminoácido es capaz de inhibir la actividad de la enzima N-acetilglutamato kinasa (NAGK) dependiendo del estado carbono:nitrógeno (C:N) de la planta en un mecanismo determinado por la proteína PII que es capaz de evitar esta inhibición en presencia de 2-oxoglutarato (Forchhammer et al., 2016). Esta inhibición ocurre desde organismos evolutivamente más primitivos, como ilustra la existencia de un mecanismo de regulación similar para la N-acetilglutamato sintasa-kinasa (NAGS-K) de *Escherichia coli*.

Como se ha comentado anteriormente, en el trabajo de Sander y colaboradores (Sander et al., 2019) se ha demostrado que los aminoácidos juegan un papel muy importante en la regulación de su propia biosíntesis, y en este caso nos encontramos con al menos un

Discusión.

punto de la ruta en que se inhibe la síntesis de arginina: la enzima NAGK. También se ha demostrado la inhibición de la enzima OTC por el aminoácido norvalina en *Bos taurus* (Marshall et al., 1972) y *Daucus carota* (Baker et al., 1983), e igualmente, en procariotas se ha estudiado el efecto inhibitorio de los productos del metabolismo de la arginina, como son las poliaminas (Tricot et al., 1994). La cisteína también se nombra en la literatura como inhibidor de la reacción para la OTC (Lee et al., 1998), aunque en este caso se debe al potencial reductor de la cisteína, que probablemente cause la desestructuración del trímero y por ello no pueda darse la reacción.

La batería de compuestos analizados incluye a un representante de cada grupo de aminoácidos proteínogénicos, además de las tres poliaminas (Figura R16, R17, R18), productos del metabolismo de la arginina, cuya síntesis ocurre en el exterior del cloroplasto y, *a priori*, tendrían menos influencia en la biosíntesis de arginina.

Para la OTC (Figura R16) se observa una inhibición de la actividad en presencia de treonina, leucina, isoleucina, arginina y valina de un 25 % tanto para *P. pinaster* como para *A. thaliana*, con el añadido de la inhibición por prolina en *A. thaliana*. En ambos organismos también se observa un aumento de la actividad en presencia de las poliaminas espermidina y espermina, pero no así una reducción en presencia de putrescina, como sí ocurre en *Daucus carota* (Baker & Yon, 1983). La reducción de actividad por arginina y valina no es tan drástica como en los casos que se recogen en la literatura, para *B. taurus* (Marshall et al., 1972) pero sí que se parece a las inhibiciones determinadas en los

Discusión.

organismos *Rattus norvegicus* (Lusty et al., 1979) y *Escherichia coli* (Legrain & Stalon, 1976), con valores de K_i para la valina de 12.5 mM y 13.5 mM respectivamente.

Para el grupo de enzimas de ASSY (Figura R17), los compuestos analizados no influyen negativamente en la actividad de la enzima, con la excepción de la arginina, que reduce la actividad de las enzimas de todos los organismos hasta un 75 % de su actividad. El resto de metabolitos, incluidas las poliaminas, apenas tienen efectos significativos en la actividad.

Las enzimas ASL tampoco presentan variaciones en la actividad en presencia de los metabolitos ensayados (Figura R18). Únicamente la PpASL es muy sensible a las poliaminas espermina y espermidina, pues reducen su actividad hasta el 60 %, mientras que para las enzimas AtASL y MpASL aumentan la actividad entre un 10-15 %. La glutamina también aumenta la actividad de PpASL hasta un 20 %. En Raushel et al. (1983) se describe la inhibición completa de la enzima ASL de *B. taurus* por succinato. En este trabajo se ha medido la actividad enzimática de las ASL en presencia de succinato, con el pH corregido a 8, y no se observa inhibición de la actividad.

Los aminoácidos que más influían en la actividad enzimática fueron estudiados en mayor profundidad, para determinar hasta cuanto podía llegar la inhibición de la actividad enzimática. Dentro del grupo de las OTC, la más sensible a valina y arginina es la PpOTC reduciendo su actividad hasta un 38 % en presencia de 50 mM arginina y hasta un 24 % en presencia de 50 mM valina (Figura R19). Si bien es cierto que estas

Discusión.

concentraciones no corresponden a las que pueda darse de estos aminoácidos a nivel fisiológico, sí que pueden darse en microambientes celulares. La MpOTC también presenta sensibilidad a ambos aminoácidos, pero menor que para PpOTC, pues la reducción de actividad se queda en un 58 % en presencia de 60 mM valina y un 55 % en presencia de 60 mM arginina (Figura R21). Es la AtOTC la enzima que presenta menor inhibición por ambos aminoácidos, pues sólo se reduce hasta un 83 % en presencia de 30 mM valina, mientras que para 30 mM arginina llega hasta un 55 % (Figura R20). En este caso, y siguiendo con la hipótesis anterior, parece ser que la ausencia de ODC podría haber favorecido evolutivamente la reducción de la influencia de otros compuestos diferentes de la arginina en la actividad de esta enzima. Sin embargo, la inhibición por arginina se mantiene, lo cual es característico de la regulación de estas enzimas por el producto final de su ruta de biosíntesis.

En el caso de las enzimas ASSY se observa la máxima inhibición por arginina en 1 mM, y no aumenta aún en presencia de 20 veces más de arginina (Figura R23). En la bibliografía se describen varios aminoácidos, además de la propia arginina, involucrados también en la inhibición de la actividad de las enzimas ASSY, como isoleucina o valina (Takada, 1979) en *Rattus norvegicus*, pero como se puede observar en la gráfica (Figura R17), ninguno de estos aminoácidos influye en la actividad de las enzimas ASSY de plantas.

Para el grupo de enzimas ASL, se observa únicamente sensibilidad ante las poliaminas espermina y espermidina, y únicamente para el

Discusión.

organismo *P. pinaster*, llegando a reducir la actividad de la enzima hasta un 4 % en presencia de 50 mM espermina, y hasta un 25 % en presencia de 50 mM espermidina (Figura R24, R25). Aunque se ha descrito inhibición de la actividad enzimática para la OTC de *Pseudomonas aeruginosa* por espermidina (Tricot, 1994), es la primera vez que se describe este tipo de inhibición por poliaminas para la ASL de una especie vegetal.

7. Estudio de líneas mutantes para los genes *otc*, *assy* y *asl* en *Arabidopsis thaliana*.

Debido a la importancia que tiene esta ruta en la biología de todos los organismos, y dado que los genes en las especies estudiadas se encuentran en una sola copia en el genoma, excepto para *P. patens*, se investigó la posibilidad de que hubiese rutas alternativas de síntesis de arginina, o bien enzimas que pudiesen sustituir la actividad de las principales OTC, ASSY y ASL.

Para ello se adquirieron semillas de *A. thaliana* procedentes de líneas mutantes para los genes correspondientes *Atotc*, *Atassy* y *Atasl*. Tras analizar las descendencias de varias generaciones, no se han podido obtener homocigotos para la inserción de las líneas mutantes en los casos de *Atotc* y *Atasl* (Figuras R26-R31). Además, en las silicuas de las plantas heterocigotas se puede observar la ausencia de semillas en algunas posiciones que, comparando con las silicuas de las plantas silvestres (wt) (Figura R32), podrían corresponder a los homocigotos

abortados, pues no se podría generar arginina durante el desarrollo de la semilla, como se puede ver en las figuras R33, R35.

Existe un caso particular, el de la línea SALK 145430 que, aun siendo individuos homocigotos, no se observa la ausencia de semillas en las silicuas (Figura R34). La explicación para este fenómeno reside en la posición en la que se localiza la inserción del T-DNA. En esta línea se encuentra al inicio del gen, en la región 5' por encima del CDS. El hecho de que no sea una interrupción completa del gen ha permitido que se transcriba el gen y se genere la proteína. También ocurre que la inserción contiene regiones promotoras constitutivas propias, que pueden haber influido en los altos niveles de expresión del gen *Atassy* en los mutantes cuando se compara con las plantas wt, en lugar de quedarse a 0 como se esperaría en los mutantes o a 1 como se esperaría en los wt (Figura R36).

8. Discusión general.

El nitrógeno del suelo en forma de amonio se incorpora a la planta y es rápidamente transformado en arginina, para acumularse transitoriamente y poder remobilizarse, incluso en presencia de altas concentraciones de amonio (El Omari et al., 2010). La toxicidad ácida causada por la presencia y acúmulo de altas concentraciones de amonio provoca la pérdida de gravitropismo radicular, debido a la protonación de la auxina ($IAA \rightarrow IAAH$), que no está sujeta a transporte activo, y puede difundir por las membranas (Jia et al., 2020). La acumulación del amonio captado a través del ciclo GS-GOGAT en forma de glutamina

Discusión.

primero, y posteriormente en forma de arginina, reduce también el potencial carácter ácido cuando se acumula amonio en las raíces, reduciendo así el estrés que sufre la raíz, lo que permite que se acumule de nuevo auxina desprotonada (IAA) y se retome el desarrollo radicular (Wuan et al., 2021). Ello concuerda con estudios previos sobre el metabolismo del nitrógeno en otras especies vegetales que demostraron la importancia de las enzimas de la ruta de biosíntesis de arginina en las plantas (Xia et al., 2014) y en consonancia con estudios recientes hechos en arroz (Wuan et al., 2021).

La regulación alostérica de la enzima OTC por arginina implica la aparición de un nuevo punto de regulación en la síntesis de compuestos derivados de ornitina. La reducción de la actividad de la OTC en presencia de arginina podría derivar el nitrógeno acumulado hacia otras rutas de síntesis, como pueden ser prolina o putrescina, controlando así de forma indirecta, los niveles de ácido γ -aminobutírico (GABA) en las células (Majumdar et al., 2013). De esta forma, ante una súbita síntesis de arginina derivada de la captación de amonio, tanto GABA como poliaminas generarían respuestas de desarrollo y defensa para evitar el estrés por pH ácido, devolviendo así el desarrollo radicular al restaurarse los niveles de auxina no protonada (IAA) (Khan et al., 2021).

Los estudios con plantas mutantes nos han permitido concluir que las enzimas son esenciales para la correcta fisiología y viabilidad de los organismos. Además, se han obtenido nuevos resultados que ahondan en el conocimiento de la regulación de estas enzimas, y de la ruta en general, pues se han descrito nuevos mecanismos de regulación por

Discusión.

metabolitos, principalmente para OTC y ASL, y se ha abierto una nueva hipótesis sobre el papel que puede jugar la ODC en la ruta de biosíntesis y su interconexión con las respuestas hormonales de la planta ante la nutrición nitrogenada.

Conclusiones.

1. El estudio de las propiedades moleculares y cinéticas de las enzimas implicadas en la conversión de ornitina a arginina sugiere que la enzima ornitina transcarbamoilasa regula alostéricamente la homeostasis del aminoácido ornitina. La ornitina puede ser precursor de la biosíntesis de arginina en el cloroplasto y también de otros compuestos nitrogenados en el citosol.
2. El aminoácido arginina actúa regulando su propia biosíntesis mediante inhibición por retroalimentación de la proteína ornitina transcarbamoilasa, enzima clave en el control metabólico de la ruta lineal de la biosíntesis de arginina en las plantas vasculares.
3. La ausencia de la enzima ornitina descarboxilasa implica un aumento de la eficiencia de la ruta de biosíntesis de arginina en ciertas plantas vasculares.
4. Los estudios moleculares y análisis funcionales realizado con las líneas mutantes para varios genes de la ruta sugieren que no existe una ruta alternativa para la biosíntesis de arginina en plantas.

Referencias.

5. Productos derivados del metabolismo de la arginina, como las poliaminas espermina y espermidina, influyen en la biosíntesis de la propia arginina a nivel de la enzima argininosuccinato liasa, en *Pinus pinaster*.

Referencias.

Alcázar R and Tiburcio AF in Thomas B, Murray BG and Murphy DJ. Applied Plant Sciences Vol 1: Plant Physiology and Development, Second Edition, 2017. Elsevier Ltd.

Alcázar R, Tiburcio AF. Determination of Arginine and Ornithine Decarboxylase Activities in Plants. *Methods Mol Biol.* 2018; 1694:117-122. Doi: 10.1007/978-1-4939-7398-9_11.

Ali MA, Louche J, Legname E, Duchemin M, Plassard C. *Pinus pinaster* seedlings and their fungal symbionts show high plasticity in phosphorus acquisition in acidic soils, *Tree Physiology*, 2009, Volume 29, Issue 12, Pages 1587–1597. Doi: 10.1093/treephys/tpp088

Allona I, Casado R, Aragoncillo C. Seed storage protein from *Pinus pinaster* Ait.: homology of major components with 11S proteins from angiosperms. *Plant Sci.* 1992, 87, 9-18. Doi: 10.1016/0168-9452(92)90188-R

Allona I, Collada C, Casado R, Aragoncillo C. 2S Arginine-rich proteins from *Pinus pinaster* seeds, *Tree Physiology*, 1994, Volume 14, Issue 2, February, Pages 211–218. Doi: 10.1093/treephys/14.2.211

Almagro-Armenteros JJ, Salvatore M, Winther O, Emanuelsson O, von Heijne G, Elofsson A, Nielsen H. Detecting Sequence Signals in Targeting Peptides Using Deep Learning *Life Science Alliance* 2019, 2 (5), e201900429. Doi:10.26508/lsa.201900429

Astier J, Gross I, Durner J. Nitric oxide production in plants: an update, *J. of Exp. Bot.*, Volume 69, Issue 14, 22 June 2018, Pages 3401–3411. Doi: 10.1093/jxb/erx420

Bae DH, Lane DJR, Jansson PJ, Richardson DR. The old and new biochemistry of polyamines. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2018, Sep;1862(9):2053-2068. Doi: 10.1016/j.bbagen.2018.06.004

Referencias.

- Baker SR, Yon RJ. Characterization of ornithine carbamoyltransferase from cultured carrot cells of low embryogenic potential. *Phytochemistry* (1983), 22, 2171-2174. Doi: 10.1016/S0031-9422(00)80139-9
- Baud S, Boutin JP, Miquel M, Lepiniec L, Rochat C. An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Phys. and Biochem.*, 2002, Volume 40, Issue 2, Pages 151-160, ISSN 0981-9428. Doi: 10.1016/S0981-9428(01)01350-X.
- Baugh L, *et al.* Combining functional and structural genomics to sample the essential Burkholderia structome. *PLoS One*. 2013;8(1):e53851. Doi: 10.1371/journal.pone.0053851 .
- Beez S, Fokina O, Herrmann C, Forchhammer K. N-acetyl-L-glutamate kinase (NAGK) from oxygenic phototrophs: P(II) signal transduction across domains of life reveals novel insights in NAGK control. *J Mol Biol.* 2009 Jun 19;389(4):748-58. Doi: 10.1016/j.jmb.2009.04.053 .
- Bellocco E, Di Salvo C, Lagana G, Galtieri A, Ficarra S, Kotyk A and Leuzzi U. Ornithine carbamoyltransferase from *Spinacea oleracea*: purification and characterization. *Biol. Plant* 2002, 45 (4): 533-538. Doi: 10.1023/A:1022368924239
- Bellocco E, Di Salvo C, Laganá G, Leuzzi U, Tellone E, Kotyk A, Galtieri A. Purification and properties of ornithine carbamoyltransferase from loggerhead turtle liver. *Physiol Res.* 2002, 51(2):151-8, [enlace]
- Berhart DN, Wreath AR. Colorimetric Determination of Phosphorus by Modified Phosphomolybdate Method. *Anal. Chem.* 1955, 27, 440-441. Doi: 10.1021/ac60099a035
- Bray RC, Ratner S. Argininosuccinase from bovine kidney: comparison of catalytic, physical, and chemical properties with the enzyme from bovine liver. *Arch Biochem Biophys.* 1971, Oct;146(2):531-41. Doi: 10.1016/0003-9861(71)90158-5

Referencias.

Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999 Dec; 31(6): 577-96. Doi: 10.1080/10715769900301161 .

Burén S, Rubio LM. State of the art in eukaryotic nitrogenase engineering. *FEMS Microbiol. Lett.* 2018, Feb 1;365(2):fmx274. Doi: 10.1.93/femsle/fmx274.

Burrell M, Hanfrey CC, Murray EJ, Stanley-Wall NR, Michael AJ. Evolution and multiplicity of arginine decarboxylases in polyamine biosynthesis and essential role in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *J Biol Chem.* 2010, Dec 10;285(50):39224-38. Doi: 10.1074/jbc.M110.163154 .

Canales J, Bautista R, *et al.* *De novo* assembly of maritime pine transcriptome: implications for forest breeding and biotechnology. *Plant Biotech. J.*, 2014, 12: 286-299. Doi: 10.1111/pbi.12136

Cánovas FM, Ávila C, Cantón FR, Cañas RA, de la Torre F. Ammonium assimilation and amino acid metabolism in conifers, *J. of Exp. Bot.*, 2007, Volume 58, Issue 9, Pages 2307–2318. Doi: 10.1093/jxb/erm051

Cánovas FM, Cantón FR, García-Gutiérrez A, Gallardo F, Crespillo R. Molecular physiology of glutamine and glutamate biosynthesis in developing conifer seedlings, *Physiologia Plantarum*, 1998, vol. 103 (pg. 287-294). Doi: 10.1034/j.1399-3054.1998.1030217.x

Cantón FR, García-Gutiérrez A, Crespillo R, Cánovas FM. High-level expression of *Pinus sylvestris* glutamine synthetase in *Escherichia coli*. Production of polyclonal antibodies against the recombinant protein and expression studies in pine seedlings. *FEBS Lett.* 1996, 393, 205–210. Doi: 10.1016/0014-5793(96)00886-1

Cañas RA, Feito I, Fuente-Maqueda JF, *et al.* Transcriptome-wide analysis supports environmental adaptations of two *Pinus pinaster* populations from contrasting habitats. *BMC Genomics* 2015, 16, 909. Doi: 10.1186/s12864-015-2177-x

Referencias.

Cañas RA, Li Z, Pascual MB, Castro-Rodríguez V, Ávila C, Sterck L, Van de Peer Y, Cánovas FM. The gene expression landscape of pine seedling tissues. *Plant J*. 2017, Sep;91(6):1064-1087. Doi: 10.1111/tpj.13617.

Cañas, RA, de la Torre, F, Cánovas, FM, Cantón FR. High levels of asparagine synthetase in hypocotyls of pine seedlings suggest a role of the enzyme in re-allocation of seed-stored nitrogen. *Planta* 2006, 224, 83–95. Doi: 10.1007/s00425-005-0196-6

Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from Pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1993 11 (2) 113-116. Doi: 10.1007/BF02670468.

Chapman TL, Shull TB, Raushel FM. Stereochemical probes of the argininosuccinate synthetase reaction. *Biochemistry*. 1986 Aug 26;25(17):4739-44. Doi: 10.1021/bi00365a003

Cruz C, Egsgaard H, Trujillo C, Ambus P, Requena N, Martins-Loução MA, Jakobsen I. Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Physiol*. 2007 Jun;144(2):782-92. Doi: 10.1104/pp.106.090522 .

Danjon F, Fourcaud T, Bert D. Root architecture and wind-firmness of mature *Pinus pinaster*. *New Phytologist*, 2005, 168: 387-400. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01497.x

Daryanto S, Wang L, Gilhooly WP-III, Jacinthe PA, Nitrogen preference across generations under changing ammonium nitrate ratios, *J. of Plant Ecol.*, 2019, Volume 12, Issue 2, April, Pages 235–244. Doi: 10.1093/jpe/rty014

Davison J, Ammann K. New GMO regulations for old: Determining a new future for EU crop biotechnology. *GM Crops Food*. 2017 Jan 2;8(1):13-34. Doi: 10.1080/21645698.2017.1289305.

De Angelis M, Mariotti L, Rossi J, Servili M, Fox PF, Rollán G, Gobbetti M. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from

Referencias.

Lactobacillus sanfranciscensis CB1. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Dec;68(12):6193-201. Doi: 10.1128/AEM.68.12.6193-6201.2002 .

de la Torre F, Cañas RA, Pascual MB, Ávila C, Cánovas FM. Plastidic aspartate aminotransferases and the biosynthesis of essential amino acids in plants, *J. of Exp. Bot*, 2014, Volume 65, Issue 19, Pages 5527–5534. Doi: 10.1093/jxb/eru240

de Ruiter H, Kollöffel C. Properties of Ornithine Carbamoyltransferase from *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.* 1985 Mar;77(3):695-9. Doi: 10.1104/pp.77.3.695

Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(6): 1349. Doi: 10.1093/nar/19.6.1349

El Omari R, Rueda-López M, Ávila C, Crespillo R, Nhiri M, Cánovas FM. Ammonium tolerance and the regulation of two cytosolic glutamine synthetases in the roots of sorghum. *Func. Plant Biol.* 2010, 37, 55-63. Doi: 10.1071/FP09162.

El-Sayed ASA, Hassan MN, Nada HMS. Purification, immobilization, and biochemical characterization of L-arginine deiminase from thermophilic *Aspergillus fumigatus* KJ434941: anticancer activity in vitro. *Biotechnol. Prog.* 2015, Mar-Apr;31(2):396-405. Doi: 10.1002/btpr.2045

El-Sayed ASA, Shindia AA, Zeid AAA, Yassin AM, Sitohy MZ, Sitohy B. *Aspergillus nidulans* thermostable arginine deiminase-Dextran conjugates with enhanced molecular stability, proteolytic resistance, pharmacokinetic properties and anticancer activity. *Enzyme Microb. Technol.* 2019, Dec; 131:109432. Doi: 10.1016/j.enzmictec.2019.109432.

Farjon A y Filer D. (2013). *An Atlas of the World's Conifers*. Brill, Leiden & Boston Doi: 10.1163/9789004211810.

Farrell K, Overton S. Characterization of argininosuccinate lyase (EC 4.3.2.1) from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem J.* 1987, Feb 15;242(1):261-6. doi: 10.1042/bj2420261 .

Referencias.

Feng J, Chen L, Zuo J. Protein S-Nitrosylation in plants: Current progresses and challenges. *J Integr Plant Biol.* 2019, Dec;61(12):1206-1223. Doi: 10.1111/jipb.12780.

Fernández-Pozo N, Canales J, Guerrero-Fernández D. *et al.* EuroPineDB: a high-coverage web database for maritime pine transcriptome. *BMC Genomics* 2011, 12, 366. Doi: 10.1186/1471-2164-12-366

Ferrario-Méry S, Besin E, Pichon O, Meyer C, Hodges M. The regulatory PII protein controls arginine biosynthesis in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 2006, Apr 3;580(8):2015-20. Doi: 10.1016/j.febslet.2006.02.075.

Forchhammer K, Lüddecke J. Sensory properties of the PII signalling protein family. *FEBS J.* 2016, Feb;283(3):425-37. Doi: 10.1111/febs.13584.

Gea-Izquierdo G, Ferriz M, García-Garrido S, Aguín O, Elvira-Recuenco M, Hernandez-Escribano L, Martin-Benito D, Raposo R. Synergistic abiotic and biotic stressors explain widespread decline of *Pinus pinaster* in a mixed forest. *Sci. of The Total Env.*, 2019, Volume 685, Pages 963-975, ISSN 0048-9697. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.378.

Gevrekci AÖ. The roles of polyamines in microorganisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2017, Oct 27;33(11):204. Doi: 10.1007/s11274-017-2370-y .

Gimenez-Ibanez S, Zamarreño AM, García-Mina JM, Solano R. An Evolutionarily Ancient Immune System Governs the Interactions between *Pseudomonas syringae* and an Early-Diverging Land Plant Lineage. *Current Biology*, 2019, Volume 29, Issue 14, Pages 2270-2281.e4. Doi: 10.1016/j.cub.2019.05.079.

Glenn E, Maretzki A. Properties and Subcellular Distribution of Two Partially Purified Ornithine Transcarbamoylases in Cell Suspensions of Sugarcane. *Plant Physiology*, 1977, Volume 60, Issue 1, July, Pages 122–126, 10.1104/pp.60.1.122

Referencias.

Glibert PM. Eutrophication, harmful algae and biodiversity - Challenging paradigms in a world of complex nutrient changes. *Mar. Pollut. Bull.* 2017, Nov 30;124(2):591-606. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.04.027.

Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* 2018, Jan; 27(1):14-25. Doi: 10.1002/pro.3235

Goto M, Omi R, Miyahara I, Sugahara M, Hirotsu K. Structures of argininosuccinate synthetase in enzyme-ATP substrates and enzyme-AMP product forms: stereochemistry of the catalytic reaction. *J Biol Chem.* 2003, Jun 20;278(25):22964-71. Doi: 10.1074/jbc.M213198200 .

Groß F, Rudolf EE, Thiele B, Durner J, Astier J. Copper amine oxidase 8 regulates arginine-dependent nitric oxide production in *Arabidopsis thaliana*, *J. of Exp. Bot.*, 2017, Volume 68, Issue 9, 1 April, Pages 2149–2162. Doi: 10.1093/jxb/erx105

Guerreiro JR, Lameu C, Oliveira EF, Klitzke CF, Melo RL, Linares E, Augusto O, Fox JW, Lebrun I, Serrano SM, Camargo AC. Argininosuccinate synthetase is a functional target for a snake venom anti-hypertensive peptide: role in arginine and nitric oxide production. *J Biol Chem.* 2009, Jul 24;284(30):20022-33. Doi: 10.1074/jbc.M109.021089

Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ. *Arabidopsis* polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J.* 2001 Sep;27(6):551-60. Doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.01100.x

Henkhaus N, *et al.* Plant science decadal vision 2020–2030: Reimagining the potential of plants for a healthy and sustainable future. *Plant Direct*, 2020, 00:1-24. Doi: 10.1002/pld3.252

Hsieh MH, Lam HM, van de Loo FJ, Coruzzi G. A PII-like protein in *Arabidopsis*: Putative role in nitrogen sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998, 95, 13965–13970. Doi: 10.1073/pnas.95.23.13965

Referencias.

Hu Y, Sun G. Leaf nitrogen dioxide uptake coupling apoplastic chemistry, carbon/sulfur assimilation, and plant nitrogen status. *Plant Cell Rep.* 2010, Oct;29(10):1069-77. Doi: 10.1007/s00299-010-0898-5.

Ishizaki T, Ohsumi C, Totsuka K, Igarashi D. Analysis of glutamate homeostasis by overexpression of Fd-GOGAT gene in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids.* 2010, Mar;38(3):943-50. Doi: 10.1007/s00726-009-0303-2.

Jia L, Xie Y, Wang Z, Luo L, Zhang C, Pélissier PM, Parizot B, Qi W, Zhang J, Hu Z, Motte H, Luo L, Xu G, Beeckman T, Xuan W. Rice plants respond to ammonium stress by adopting a helical root growth pattern. *Plant J.* 2020, Nov;104(4):1023-1037. Doi: 10.1111/tpj.14978 .

Joshua N, Schimel P, Stuart Chapin III F. Tundra Plant Uptake of Amino Acid and NH₄⁺ Nitrogen in Situ: Plants Complete Well for Amino Acid. *Ecology.* 1996, 77(7): 2142-2147. Doi: 10.2307/2265708

Jumper, J, Evans, R, Pritzel, A *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021, 596, 583–589. Doi: 10.1038/s41586-021-03819-2

Karlberg T, Collins R, van den Berg S, Flores A, Hammarström M, Högbom M, Holmberg Schiavone L, Uppenberg J. Structure of human argininosuccinate synthetase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2008, Mar; 64(Pt 3): 279-86. Doi: 10.1107/s0907444907067455

Katano H, Tanaka R, Maruyama C, Hamano Y. Assay of enzymes forming AMP + PPi by the pyrophosphate determination based on the formation of 18-molybdopyrophosphate. *Anal. Biochem.* 2012, 421, 308–312. Doi: 10.1016/j.ab.2011.10.031

Kelley LA, *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 2015, 10, 845-858. Doi: 10.1038/nprot.2015.053

Referencias.

Khan MIR, Jalil SU, Chopra P, Chhillar H, Ferrante A, Khan NA, Ansari MI. Role of GABA in plant growth, development and senescence. *Plant G*. 2021, 26:100283. Doi: 10.1016/j.plgene.2021.100283.

Kim SC, Raushel FM. Isotopic probes of the argininosuccinate lyase reaction. *Biochemistry*. 1986, Aug 26;25(17):4744-9. Doi: 10.1021/bi00365a004

Kwang C & Yoonmi K & Pil J. Adverse Effect of Planting pine on coastal dunes, Korea. 2013, 65. Doi: 10.2112/SI65-154.1.

Lang D, *et al.* The *Physcomitrella patens* chromosome-scale assembly reveals moss genome structure and evolution. *Plant J*. 2018, Feb;93(3):515-533. Doi: 10.1111/tpj.13801.

Lee MW, Jelenska J, Greenberg JT. *Arabidopsis* proteins important for modulating defense responses to *Pseudomonas syringae* that secrete HopW1-1. *Plant J*. 2008, May;54(3):452-65. Doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03439.x.

Lee Y, Bum Lee C, Kim SG, Myung Kwon Y. Purification and characterization of ornithine carbamoyltransferase from the chloroplasts of *Canavalia lineata* leaves. *Plant Sci*. 1997, Volume 122, Issue 2, 28 February, Pag 217-224. Doi: 10.1016/S0168-9452(96)04547-5

Lee Y, Jun BO, Kim SG, Kwon YM. Purification of ornithine carbamoyltransferase from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves and comparison of the properties of the enzyme from canavanine-containing and -deficient plants. *Planta*. 1998, Jul;205(3):375-9. Doi: 10.1007/s004250050333 .

Lee Y, Kwon YM. Identification of an isoform of ornithine carbamoyltransferase that can effectively utilize canaline as a substrate from the leaves of *Canavalia lineata*. *Plant Sci*. 2000, Feb 21;151(2):145-151. Doi: 10.1016/s0168-9452(99)00208-3 .

Legrain C, Stalon V. Ornithine carbamoyltransferase from *Escherichia coli* W. Purification, structure and steady-state kinetic analysis. *Eur J*

Referencias.

Biochem. 1976, Mar 16;63(1):289-301. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1976.tb10230.x.

Lelu-Walter MA, Bernier-Cardou M, Klimaszewska K. Simplified and improved somatic embryogenesis for clonal propagation of *Pinus pinaster* (Ait.). *Plant Cell Rep.* 2006, 25, 767–776. Doi: doi.org/10.1007/s00299-006-0115-8.

Li L, Li Z, Wang C, Xu D, Mariano PS, Guo H, Dunaway-Mariano D. The electrostatic driving force for nucleophilic catalysis in L-arginine deiminase: a combined experimental and theoretical study. *Biochemistry.* 2008, Apr 22;47(16):4721-32. Doi: 10.1021/bi7023496 .

Lindström K, Mousavi SA. Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microb. Biotechnol.* 2020, Sep;13(5):1314-1335. Doi: 10.1111/1751-7915.13517.

Liu X, Hu B, Chu C. Nitrogen assimilation in plants: current status and future prospects. *J. Genet. Genomics.* 2021, Dec 30: S1673-8527(21)00376-3. Doi: 10.1016/j.jgg.2021.12.006.

Llácer JL, Fita I, Rubio V. Arginine and nitrogen storage. *Current Opinion in Structural Biology*, 2008, Volume 18, Issue 6, Pages 673-681, ISSN 0959-440X. Doi: 10.1016/j.sbi.2008.11.002.

Llebrés MT, Pascual MB, Debille S, Trontin JF, Harvengt L, Avila C, Cánovas FM. The role of arginine metabolic pathway during embryogenesis and germination in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Tree Physiol.* 2018, Mar 1;38(3):471-484. Doi: 10.1093/treephys/tpx133

Llebrés MT, Pascual MB, Valle C, de la Torre FN, Valderrama-Martin JM, Gómez, L, Ávila C, Cánovas FM. Structural and Functional Characteristics of Two Molecular Variants of the Nitrogen Sensor PII in Maritime Pine. *Front. Plant Sci.* 2020, 11, 823. Doi: 10.3389/fpls.2020.00823

Referencias.

Lombardero MJ, Ayres MP. Factors Influencing Bark Beetle Outbreaks After Forest Fires on the Iberian Peninsula, *Environ. Entom.* 2011, Volume 40, Issue 5, 1, Pages 1007–1018. Doi: 10.1603/EN11022

Lusty CJ, Jilka RL, Nietsch EH. Ornithine transcarbamylase of rat liver. Kinetic, physical, and chemical properties. *J Biol Chem.* 1979, Oct 25;254(20):10030-6. [enlace]

Lusty CL and Ratner S. Biosynthesis of urea. XIV. The quaternary structure of argininosuccinase. *J. Biol. Chem.* 1972, Nov 10;247(21):7010-22 [enlace].

Majumdar R, Shao L, Minocha R, Long S, Minocha SC. Ornithine: the overlooked molecule in the regulation of polyamine metabolism. *Plant Cell Physiol.* 2013, Jun;54(6):990-1004. Doi: 10.1093/pcp/pct053 .

Makineci E. Nitrogen accumulation in forest floors with introduced *Pinus pinea* and *Pinus pinaster* in dune site. *Environ. Monit. Assess* 2021, 193, 327. Doi: 10.1007/s10661-021-09100-3.

Manley B. Impact on profitability, risk, optimum rotation age and afforestation of changing the New Zealand emissions trading scheme to an averaging approach. *Forest Policy and Economics.* 2020, 116: 102205. Doi: 10.1016/j.forpol.2020.102205.

Marshall M, Cohen PP. Ornithine transcarbamylase from *Streptococcus faecalis* and bovine liver. II. Multiple binding sites for carbamyl-P and L-norvaline, correlation with steady state kinetics. *J Biol Chem.* 1972, Mar 25;247(6):1654-68. Doi: 10.1016/S0021-9258(19)45529-4

Martin F, Hirel B, Gadal P. Purification and properties of ornithine carbamoyltransferase 1 from *Alnus glutinosa* root nodules. *Pflanzenphysiol.* 1983, 111, 413-422. Doi: 10.1016/S0044-328X(83)80005-1

Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A. Nitrogen uptake, assimilation and

Referencias.

remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot.* 2010, Jun;105(7):1141-57. Doi: 10.1093/aob/mcq028

Matagne RF, Schlösser JP. Purification and subunit structure of argininosuccinate lyase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem J.* 1977, Oct 1;167(1):71-5. Doi: 10.1042/bj1670071

Matsuda Y, Tsuji A, Katunuma N, Hayashi M, Takahashi Y. Studies on liver argininosuccinate synthetase in a patient with citrullinemia and in normal subjects. *J Biochem.* 1979, Jan;85(1):191-5. Doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132309 .

Monzani PS, Moraes G. Urea cycle enzymes through the development of pacu (*Piaractus mesopotamicus*): the role of ornithine carbamoyl transferase. *Fish Physiol Biochem.* 2008, Jun;34(2):139-49. Doi: 10.1007/s10695-007-9154-5 .

Moyano J, Rodriguez-Cabal MA, Nuñez MA. Highly invasive tree species are more dependent on mutualisms. *Ecology* 2020, 101(5): e02997. Doi: 10.1002/ecy.2997

Müller T, Avolio M, Olivi M, Benjdia M, Rikirsch E, Kasaras A, Fitz M, Chalot M, Wipf D. Nitrogen transport in the ectomycorrhiza association: the *Hebeloma cylindrosporum-Pinus pinaster* model. *Phytochemistry.* 2007, Jan;68(1):41-51. Doi: 10.1016/j.phytochem.2006.09.021 .

Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, Schlereth A, Tiedemann J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *J Exp Bot.* 2001, Sep;52(362):1741-52. Doi: 10.1093/jexbot/52.362.1741 .

Müntz K. Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol.* 1998, Sep;38(1-2):77-99. [enlace]

Referencias.

Muro-Pastor MI, Reyes JC, Florencio FJ. Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynth. Res.* 2005, 83(2):135-50. Doi: 10.1007/s11120-004-2082-7.

Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U. Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.* 2009, 182(1):31-48. Doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x.

Nelson & Cox, Lehninger's Principles of Biochemistry 4th Edition, 2004, WH Freeman & Co, p.207, Table 6-8.

Núñez MA, Chiuffo MC, Torres A, *et al.* Ecology and management of invasive Pinaceae around the world: progress and challenges. *Biol Invasions*, 2017, 19, 3099–3120. Doi: 10.1007/s10530-017-1483-4

NZ Farm Forestry - NZFFA guide sheet No. 1: An Introduction to Growing Radiata Pine. www.nzffa.org.nz. Retrieved 2020-08-03.

NZ Farm Forestry - Radiata pine silviculture in Chile. www.nzffa.org.nz. Retrieved 2020-08-03

O'Brien WE, Barr RH. Argininosuccinate lyase: purification and characterization from human liver. *Biochemistry.* 1981, Mar 31;20(7):2056-60. Doi: 10.1021/bi00510a049

Oldroyd GE. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, Apr;11(4):252-63. Doi: 10.1038/nrmicro2990.

O'neal TD. In Vitro Synthesis of Ureidohomoserine by an Enzyme from Jack Bean (*Canavalia ensiformis*) Leaves. *Plant Physiol.* 1975, Jun;55(6):975-7. Doi: 10.1104/pp.55.6.975

Ortigosa F, Lobato-Fernández C, Pérez-Claros JA, Cantón FR, Ávila C, Cánovas FM, Cañas RA. Epitranscriptome changes triggered by ammonium nutrition regulate the proteome response of maritime pine roots. *bioRxiv* 2021.04.20.440618; Doi: 10.1101/2021.04.20.440618v2

Referencias.

Ortigosa F, Valderrama-Martín JM, Urbano-Gámez JA, García-Martín ML, Ávila C, Cánovas FM, Cañas RA. Inorganic Nitrogen Form Determines Nutrient Allocation and Metabolic Responses in Maritime Pine Seedlings. *Plants* 2020, 9, 481. Doi: 10.3390/plants9040481

Osborne TB. *The Vegetable Proteins*, 2nd ed.; Longmans, Green and Co.: London, UK, 1924; pp. 1–154.

Palekar AG, Mantagos S. Human liver argininosuccinase purification and partial characterization. *J Biol Chem.* 1981, Sep 10;256(17):9192-4. [enlace]

Peoples MB, Freney JR, Mosier AR. Minimizing gaseous losses of nitrogen. In: Bacon PE, editor. *Nitrogen fertilization in the environment*. New York, Marcel Dekker, Inc.; 1995. p. 565-602.

Pierson DL, Cox SL, Gilbert BE. Human ornithine transcarbamylase. Purification and characterization of the enzyme from normal liver and the liver of a Reye's syndrome patient. *J Biol Chem.* 1977, Sep 25;252(18):6464-9. [enlace]

Poveda J. *Marchantia polymorpha* as a model plant in the evolutionary study of plant-microorganism interactions. *Current Plant Biology*, 2020, Volume 23, 100152. Doi: 10.1016/j.cpb.2020.100152.

Qiao WT, Peng KL, Zhong C, Asher P, Provart N, Mutwil M. *Marchantia polymorpha* gene expression atlas reveals the hierarchy of abiotic stress responses and conservation of diurnal gene expression. *BioRxiv* 2021, 10.1101/2021.11.12.468350.

Rasheed F, Markgren J, Hedenqvist M, Johansson E. Modeling to Understand Plant Protein Structure-Function Relationships—Implications for Seed Storage Proteins. *Molecules* 2020, 25, 873. Doi: 10.3390/molecules25040873

Ratner S. Enzymes of arginine and urea synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1973;39:1-90. Doi: 10.1002/9780470122846.ch1.

Referencias.

Rensing SA, Goffinet B, Meyberg R, Wu SZ, Bezanilla M. The Moss *Physcomitrium (Physcomitrella) patens*: A Model Organism for Non-Seed Plants. *Plant Cell*. 2020, May;32(5):1361-1376. Doi: 10.1105/tpc.19.00828 .

Reski R, Bae H, Simonsen HT. *Physcomitrella patens*, a versatile synthetic biology chassis. *Plant Cell Rep.*, 2018, 37, 1409–1417. Doi: 10.1007/s00299-018-2293-6

Rochovansky O, Kodowaki H, Ratner S. Biosynthesis of urea. Molecular and regulatory properties of crystalline argininosuccinate synthetase. *J Biol Chem*. 1977, Aug 10;252(15):5287-94. [enlace]

Rodrigues AS, Chaves I, Costa BV, et al. Small RNA profiling in *Pinus pinaster* reveals the transcriptome of developing seeds and highlights differences between zygotic and somatic embryos. *Sci. Rep.* 2019, 9, 11327. Doi: doi.org/10.1038/s41598-019-47789-y

Rosenthal GA, Naylor AW. Purification and general properties of argininosuccinate lyase from jack bean, *Canavalia ensiformis* (L.) DC. *Biochem J*. 1969, May;112(4):415-9. Doi: 10.1042/bj1120415

Roth FA-II, Extension Forester. "Thinning to improve pine timber". University of Arkansas Division of Agriculture. Archived from the original (PDF) on 9 October 2016. Retrieved 3 April 2016.,

Sagra J, Ferrandis P, Plaza-Álvarez PA, Lucas-Borja ME, González-Romero J, Alfaro-Sánchez R, De las Heras J, Moya D. Regeneration of *Pinus pinaster* Aiton after prescribed fires: Response to burn timing and biogeographical seed provenance across a climatic gradient. *Sci. of The Total Env.*, 2018, Volumes 637–638, Pages 1550-1558. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.138.

Sampaleanu LM, Coddling PW, Lobsanov YD, Tsai M, Smith GD, Horvatin C, Howell PL. Structural studies of duck delta2 crystallin mutants provide insight into the role of Thr161 and the 280s loop in catalysis. *Biochem J*. 2004, Dec 1;384(Pt 2):437-47. Doi: 10.1042/BJ20040656

Referencias.

Sander T, Farke N, Diehl C, Kuntz M, Glatter T, Link H. Allosteric Feedback Inhibition Enables Robust Amino Acid Biosynthesis in *E. coli* by Enforcing Enzyme Overabundance. *Cell Syst.* 2019, Jan 23;8(1):66-75.e8. Doi: 10.1016/j.cels.2018.12.005 .

Sankaranarayanan R, Cherney MM, Cherney LT, Garen CR, Moradian F, James MN. The crystal structures of ornithine carbamoyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* and its ternary complex with carbamoyl phosphate and L-norvaline reveal the enzyme's catalytic mechanism. *J Mol Biol.* 2008, Jan 25; 375(4): 1052-63. Doi: 10.1016/j.jmb.2007.11.025 .

Schulze E, Steiger E. "Ueber das Arginin" [On arginine]. *Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 1887, 11 (1-2): 43-65. [enlace]

Selim KA, Ermilova E, Forchhammer K. From cyanobacteria to Archaeplastida: New evolutionary insights into PII signalling in the plant kingdom. *New Phytol.* 2020, 227, 722-731. Doi:10.1111/nph.16492

Sellier D, Fourcaud T. A mechanical analysis of the relationship between free oscillations of *Pinus pinaster* Ait. saplings and their aerial architecture. *J. of Exp. Bot.*, 2005, Volume 56, Issue 416, Pages 1563-1573. Doi: 10.1093/jxb/eri151

Shargool, PD. Purification of argininosuccinate synthetase from cotyledons of germinating peas. *Phytochemistry* 1971, 10, 2029-2032. Doi: 10.1016/S0031-9422(00)97189-9

Shewry PR, Napier JA, Tatham AS. Seed storage proteins: Structures and biosynthesis. *Plant Cell* 1995, 7,945-956. Doi: 10.1105/tpc.7.7.945

Shimamura M. *Marchantia polymorpha*: Taxonomy, Phylogeny and Morphology of a Model System, *Plant and Cell Physiology*, 2016, Volume 57, Issue 2, Pages 230-256. Doi: 10.1093/pcp/pcv192

Slade DJ, Fang P, Dreyton CJ, Zhang Y, Fuhrmann J, Rempel D, Bax BD, Coonrod SA, Lewis HD, Guo M, Gross ML, Thompson PR. Protein arginine deiminase 2 binds calcium in an ordered fashion: implications

Referencias.

for inhibitor design. *ACS Chem Biol.* 2015, Apr 17;10(4):1043-53. Doi: 10.1021/cb500933j.

Slocum RD, Richardson DP. Purification and characterization of ornithine transcarbamylase from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.* 1991, 96(1): 262-8. Doi: 10.1104/pp.96.1.262.

Srivenugopal KS, Adiga PR. Enzymic conversion of agmatine to putrescine in *Lathyrus sativus* seedlings. Purification and properties of a multifunctional enzyme (putrescine synthase). *J Biol Chem.* 1981, Sep 25;256(18):9532-41. [enlace]

Takada S, Saheki T, Igarashi Y, Katsunuma T. Studies on rat liver argininosuccinate synthetase. Inhibition by various amino acids. *J Biochem.* 1979, May;85(5):1309-14. Doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132454

Takano A. Thermospermine is Not a Minor Polyamine in the Plant Kingdom, *Plant and Cell Physiology*, 2012, Volume 53, Issue 4, April 2012, Pages 606–616. Doi: 10.1093/pcp/pcs019

Templeman TS, Stein DB, DeMaggio AE. A fern spore storage protein is genetically similar to the 1.7 S seed storage protein of *Brassica napus*. *Biochem Genet.* 1988, Oct;26(9-10):595-603. Doi: 10.1007/BF02399604 .

Tischner R, Galli M, Heimer YM, Bielefeld S, Okamoto M, Mack A, Crawford NM. Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in *Arabidopsis* extracts. *FEBS J.* 2007, Aug;274(16):4238-45. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05950.x

Tricot C, Schmid S, Baur H, Villeret V, Dideberg O, Haas D, Stalon V. Catabolic ornithine carbamoyltransferase of *Pseudomonas aeruginosa*. Changes of allosteric properties resulting from modifications at the C-terminus. *Eur J Biochem.* 1994, Apr 1;221(1):555-61. Doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18768.x

Referencias.

Tsai M, Koo J, Howell PL. Recovery of argininosuccinate lyase activity in duck delta1 crystallin. *Biochemistry*. 2005, Jun 28;44(25):9034-44. Doi: 10.1021/bi050346s .

Tsuji S. Chicken ornithine transcarbamylase: purification and some properties. *J Biochem.* 1983 Oct;94(4):1307-15. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134476.

Unno K, Furushima D, Hamamoto S, Iguchi K, Yamada H, Morita A, Pervin M, Nakamura Y. Stress-reducing effect of cookies containing matcha green tea: essential ratio among theanine, arginine, caffeine and epigallocatechin gallate. *Heliyon*. 2019, May 7;5(5): e01653. Doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01653

Urbano-Gómez JA, El-Azaz J, Ávila C, de la Torre FN, Cánovas FM. Enzymes Involved in the Biosynthesis of Arginine from Ornithine in Maritime Pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Plants*. 2020, Sep 27;9(10):1271. Doi: 10.3390/plants9101271.

Valledor L, Guerrero S, García-Campa L, Meijón M. Proteometabolomic characterization of apical bud maturation in *Pinus pinaster*. *Tree Physiology*, 2021, Volume 41, Issue 3, Pages 508–521. Doi: 10.1093/treephys/tpaa111

Vizcaíno-Palomar N, Revuelta-Eugercios B, Zavala MA, Alía R, González-Martínez SC. The Role of Population Origin and Microenvironment in Seedling Emergence and Early Survival in Mediterranean Maritime Pine (*Pinus pinaster* Aiton). *PLoS ONE* 2014, 9(10): e109132. Doi: 10.1371/journal.pone.0109132

Voltas J, Aguilera M, Gutiérrez E, Shestakova TA. Shared drought responses among conifer species in the middle Siberian taiga are uncoupled from their contrasting water-use efficiency trajectories. *Sci. of The Total Env.* 2020, Volume 720, 137590, ISSN 0048-9697. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137590.

Referencias.

Wakui H, Komatsuda A, Itoh H, Kobayashi R, Nakamoto Y, Miura AB. Renal argininosuccinate synthetase: purification, immunohistochemical localization, and elastin-binding property. *Ren Physiol Biochem*. 1992, Jan-Feb;15(1):1-9. Doi: 10.1159/000173435

Wei Xuan, Yuanming Xie, Yuanda Lv et al. Plastid-localized amino acid metabolism coordinates rice ammonium tolerance and nitrogen use efficiency. PREPRINT (Version 1) available at Research Square. 2022, 14 April. Doi: 10.21203/rs.3.rs-1474062/v1 .

Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G, Funck D. Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front Plant Sci*. 2015, Jul 30; 6:534. Doi: 10.3389/fpls.2015.00534

Xia J, Yamaji N, Che J, Shen RF, Ma JF. Normal root elongation requires arginine produced by argininosuccinate lyase in rice. *Plant J*. 2014, Apr;78(2):215-26. Doi: 10.1111/tpj.12476 .

Xu Y, Feller G, Gerday C, Glansdorff N. Metabolic enzymes from psychrophilic bacteria: challenge of adaptation to low temperatures in ornithine carbamoyltransferase from *Moritella abyssi*. *J Bacteriol*. 2003, Apr;185(7):2161-8. Doi: 10.1128/JB.185.7.2161-2168.2003

Yu B, Howell PL. Intragenic complementation and the structure and function of argininosuccinate lyase. *Cell Mol Life Sci*. 2000, Oct;57(11):1637-51. Doi: 10.1007/pl00000646