

Departamento de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Madrid

Glutamato- γ -carboxilasa en tejidos de *Helianthus tuberosus* cultivados "in vitro"

por

A. Bernal,* M.ª Cascales, F. Mayor y A. Santos-Ruiz

(Recibido para publicar el 21 de mayo de 1963)

El trabajo cuyos resultados presentamos se ha realizado con el fin de intentar contribuir al esclarecimiento de las actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo del 4-aminobutirato (4-AB) en tejidos vegetales. La extraordinaria difusión de este aminoácido no proteinogénico en plantas (5, 9, 19, 20, 22), animales (1, 3, 15) y microorganismos (21), así como la notable cantidad en que en muchos de ellos se encuentra, sugieren un mecanismo general de acción (2, 16, 17). Los tejidos vegetales cultivados *in vitro* permiten un control riguroso de las condiciones de desarrollo, la detección de etapas intermedias gracias a su lenta transformación y la posibilidad de realizar una investigación análoga en los tejidos tumorales correspondientes, crecidos igualmente *in vitro*. Por ello su utilización parecía especialmente apropiada para determinar la evolución de la enzima que cataliza la producción de 4-AB a partir del glutamato y su relación con la actividad celular.

Los resultados obtenidos permiten establecer una estrecha conexión entre la neoformación tisular y la actividad descarboxilante del glutamato. El hallazgo de esta actividad enzimática en los tejidos tumorales de *Helianthus* así como la relación entre el 4-AB y el ciclo crítico puesta de manifiesto mediante el empleo de 4-AB 1^{-14}C en trabajos realizados simultáneamente en nuestro laboratorio (8), confirman la activa participación del 4-AB en algunas etapas del metabolismo vegetal.

* Becario de la Fundación Juan March.

Material y métodos

CULTIVOS VEGETALES «IN VITRO». — El tubérculo de *Helianthus tuberosus* ha sido recolectado durante el período de reposo invernal que comprende desde el mes de septiembre hasta abril y se ha sembrado en medios de cultivo sintéticos. La técnica seguida en la siembra ha sido descrita con detalle por CASCALES (4). Los tubos de cultivo se mantienen en instalaciones iluminadas durante 8 horas al día. Temperatura 22-24°.

La composición de los medios de cultivo es la siguiente: *Medio normal*: Líquido de Knop (*) dil. v/v: 1.000 ml.; líquido de Heller (**) 1 ml.; Vitamina B₁: 10⁻⁶ g/l; A.N.A.: 5 × 10⁻⁷ g/l; Glucosa: 30 g.; Agar-agar: 7 g.; *Medios especiales*: Cl₂Ca₂H₂O: 500 mg.; Cl₂Mg: 125 mg.; SO₄Mg. 7H₂O: 125 mg.; PO₄H₂K: 125 mg.; líquido Heller olig.: 1 ml.; Vitamina B₁: 10⁻⁶ g/l; A₁N₂A₁: 5 × 10⁻⁷ g/l; Agar-agar: 7 g; glucosa: 30 g; agua destilada c.s.p. 1.000 ml. A este medio se añaden los siguientes aminoácidos como única fuente nitrogenada: 750 mg/l de arginina, 4-AB, o glutamato sódico. Cuando se suplementó una mezcla de arginina y 4-AB, las proporciones fueron arginina 300 mg/l y 4-AB 600 mg/l. Posteriormente estas concentraciones, recomendadas por MOREL y DURATON para la arginina (14), se sustituyeron por un aporte equimolar de los aminoácidos con los nitratos existentes en el medio normal. Esterilización durante media hora a 110° C.

PREPARACIÓN DE EXTRACTOS. Se ha utilizado un disgregador mecánico de pequeño tamaño cuando se trabaja con tubérculo de origen. La preparación de extractos a partir de los fragmentos cultivados se ha realizado en un homogeneizador tipo Potter-Elvehjem, previa disgregación en mortero sumergido en baño de hielo-sal. Los extractos con tampón fosfatos 0,2 M pH 5, 7 se filtran a través de gasa y se mide el volumen recogido. Todo el proceso se lleva a cabo en atmósfera de nitrógeno.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. Se ha efectuado mediante la técnica manométrica de Warburg, en un aparato Braun

(*) La composición de la solución de Knop es: (NO₃)₂Ca.4H₂O: 500 mg; NO₃K: 125 mg; SO₄Mg. 7H₂O: 125; PO₄H₂K: 125 mg.; Agua destilada c.s.p.: 1.000 ml.

(**) El líquido de Heller oligodinámico está compuesto por una solución de varias sales a las concentraciones que se detallan (g/ml): Cl₃Fe. 6H₂O: 10⁻⁶; SO₄Zn. 7H₂O: 10⁻⁶; BO₃H₃: 10⁻⁶; SO₄Mn. 4H₂O: 10⁻⁷; SO₄Cu. 5H₂O: 3 × 10⁻⁸; Cl₃Al: 3 × 10⁻⁸; Cl₂Ni. 6H₂O: 3 × 10⁻⁸; IK: 10⁻⁸.

modelo SL-65 provisto de un dispositivo de vidrio con 14 salidas laterales que permite realizar cómodamente el proceso de determinación en atmósfera de nitrógeno. La medida de actividad se hace con la mayor rapidez posible, con el fin de reducir la desnaturalización proteica. Los vasos de reacción contienen, en el compartimento central, 2 ml de la suspensión enzimática, 0,5 ml de tampón fosfato 0,2 M pH 5,7 y 0,5 ml de solución de PLP (piridoxal-5-fosfato) de 100 microgramos por ml. La adición de la enzima se realiza en último lugar, inmediatamente antes de llevar los vasos de reacción al aparato de Warburg. En el bulbo lateral se disponen 0,5 ml de glutamato sódico al 4 % (concentración final de sustrato: $3,88 \times 10^{-2}$ M/l). Durante un período de incubación previa de 10 minutos se hace pasar una fuerte corriente de nitrógeno (agitación de amplitud: 1 y frecuencia: 75 o.p.m.). En la lectura, que se realiza cada 2 minutos hasta un total de 10 minutos, dichas condiciones son de 3 y 150, respectivamente. La reacción tiene lugar a 37°C. La actividad se expresa en forma de QCO₂ (18) que indica los microlitros de anhídrido carbónico desprendidos en 60 minutos (lectura a los 10 minutos $\times 6$ /mgs. de proteína soluble). Los valores obtenidos se corrigen con los blancos y ciegas oportunos y se multiplican por la constante del conjunto vaso-manómetro.

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS SOLUBLES. Se ha realizado por el método de LOWRY y colaboradores (11).

Resultados

1. — CONDICIONES DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. La rápida oxidación de las sustancias fenólicas presentes en los tejidos de *Helianthus tuberosus* representa un fuerte obstáculo para los estudios enzimáticos (6). A pesar de que la glutamato l-carboxilasa no es tan sensible como otras enzimas, los datos obtenidos en los ensayos previos indicaron la conveniencia del empleo de atmósfera de nitrógeno, tanto en la preparación de los homogenados como en la medida manométrica de su actividad. Contrariamente a la glutamato descarboxilasa de *Lupinus albus* (12, 13) la enzima de *Helianthus* retiene fuertemente a la coenzima, de tal modo que la adición de piridoxal-5-fosfato no produce un incremento significativo de la actividad.

2. — EVOLUCIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA «IN VIVO». En la tabla se resumen los valores obtenidos con el tubérculo recolectado en distintos períodos del reposo invernal. Se aprecia el

Glutamato 1-Carboxilasa en Helianthus tuberosus. Evolución in vivo.

Fecha de recolección	QCO ₂ *	Fecha de recolección	QCO ₂ *
14 febrero	48	6 junio***	106
27 febrero	47	5 octubre	61
10 abril	50	8 noviembre	71
5 mayo**	89	4 diciembre	70

(*) Sin adición de PLP.

(**) Germinación manifiesta.

(***) Totalmente germinado.

mantenimiento de una actividad específica considerable, que sigue un curso ligeramente decreciente a medida que se suavizan las condiciones ambientales, para elevarse intensamente en el momento en que se produce la germinación.

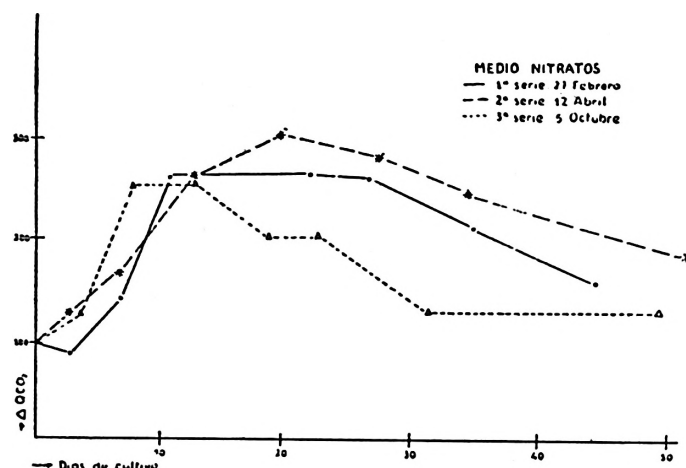


FIG. 1. Evolución de la actividad de la glutamato descarboxilasa en los tejidos normales de *Helianthus tuberosus* crecidos en el medio habitual de nitratos.

3.—ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN TEJIDOS CULTIVADOS «IN VIVO».

a) *Medio normal de nitratos.* En la figura 1 se representan los incrementos respecto al momento de la siembra (Δ QCO₂) de los valores de actividad específica hallados (sin adición de peridoxal-5-fosfato) en las tres series efectuadas, correspondientes a tejidos crecidos a partir del tubérculo recolectado en distintas etapas del letargo (febrero, abril y octubre).

b) *Medio de 4-aminobutirato.* Los datos obtenidos en las tres series realizadas empleando 4-AB como única fuente nitro-

genada se representan en la figura 2. Como en el caso del aporte normal de nitratos, pero con mayor intensidad, la máxima actividad coincide con el período de mayor neoformación tisular.

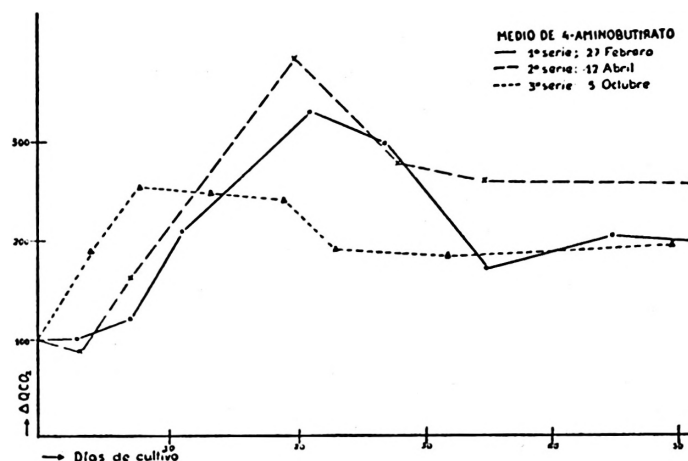


FIG. 2. Actividad de la L-glutamato 1-carboxilasa en los tejidos desarrollados en medios en los que el 4-aminobutirato constituye la única fuente nitrogenada.

c) Medio de arginina. Con el empleo del aminoácido que constituye la reserva nitrogenada natural del tubérculo de *Helianthus tuberosus*, se obtuvieron los valores de ΔQCO_2 que se indican en la figura 3. Debe destacarse la escasa variación esta-

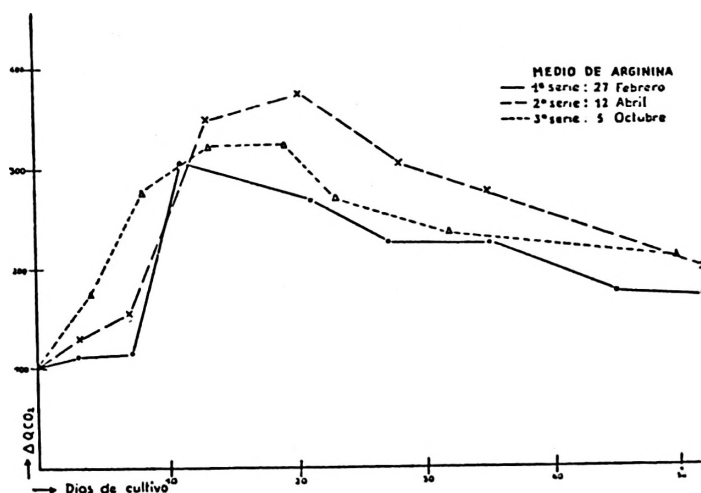


FIG. 3. Actividad descarboxilante de los fragmentos crecidos en medio especial de arginina.

cional, que se refleja en la similar evolución de las tres series ensayadas.

d) *Medios de arginina + 4-aminobutirato, glutamato y desprovisto de fuente nitrogenada.* En la suplementación de arginina y 4-AB se observó, como en los casos anteriores, un claro incremento de la actividad descarboxilante, que alcanza valores máximos a los 13 días de cultivo (Δ QCO₂: 330) decreciendo luego lentamente, dentro de niveles altos, hasta el momento de la resiembra (Δ QCO₂: 220).

En los medios adicionados de glutamato el crecimiento fue sensiblemente menor. La actividad enzimática hallada fue, paralelamente, muy escasa. Sólo en el desarrollo de fragmentos de tubérculo recolectado en el mes de octubre se obtuvieron valores significativos en el período de proliferación más intensa, pero decreciendo luego de forma muy acusada (Δ QCO₂: 140). Debe destacarse la notable riqueza en proteínas solubles de los fragmentos desarrollados en este medio.

En la 3.^a serie se incluyeron varios tubos desprovistos de fuente nitrogenada, con el fin de observar la evolución debida, exclusivamente, a los aminoácidos de reserva que contienen los fragmentos sembrados. Se obtuvieron valores elevados en las muestras correspondientes a la mayor actividad metabólica, para descender después profundamente, debido, seguramente, al agotamiento de la reserva nitrogenada.

4. — INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE AUXINA Y DE LA ADICIÓN DE LECHE DE COCO SOBRE LA ACTIVIDAD DESCARBOXILANTE DEL GLUTAMATO. Empleando medio de 4-AB, se observó la evolución enzimática en presencia de diversas concentraciones de ácido naftil-acético (1×10^{-5} ; 2×10^{-6} y 5×10^{-7} gr/1). La evolución fue sensiblemente igual en los tres casos. En los medios desprovistos de auxina, en los que el desarrollo es nulo, la actividad enzimática no experimentó la menor modificación respecto a los valores iniciales.

Con fragmentos de tubérculo recolectado en el mes de diciembre y sembrados en medio normal de nitratos, se realizó un estudio comparativo del efecto de las auxinas y de los componentes mitogénicos contenidos en la leche de coco. Su adición en la proporción del 10 % suple con total eficacia la presencia de auxina. La suplementación de ambos factores incrementó ligeramente el efecto causado aisladamente.

Discusión

El notable aumento de actividad específica descarboxilante observado en la germinación del tubérculo de *H. tuberosus*, tanto si se realiza en el campo como si se provoca en el laboratorio mediante las condiciones adecuadas, tiene lugar, asimismo, en los fragmentos desarrollados *in vitro*.

Los resultados hallados han demostrado que la actividad que presentan los tejidos en el momento de la siembra se eleva profundamente coincidiendo con la iniciación del período de proliferación activa, y se mantiene en valores altos durante la etapa de equilibrio dinámico.

La eficacia de los monopeptidos empleados como única fuente nitrogenada puede establecerse, a este respecto, en el siguiente orden decreciente: arginina, arginina y 4-aminobutirato, 4-aminobutirato y glutamato. Los valores promedios de los tres primeros superan a los obtenidos con el medio habitual de nitratos. La perfecta utilización de la arginina concuerda con el hecho de constituir la forma natural de reserva nitrogenada durante el período de letargo (14), disminuyendo el esfuerzo de acomodación para el crecimiento *in vitro*. De acuerdo con los datos obtenidos por cromatografía sobre papel (4), el 4-aminobutirato constituye, a los efectos enzimáticos, una eficaz fuente nitrogenada.

La variación estacional destacada por diversos autores en otros aspectos (7) se manifiesta claramente en los estudios enzimáticos que hemos llevado a cabo.

De la observación de las diversas series realizadas, se deduce que la actividad específica alcanza valores superiores en los tejidos procedentes de tubérculo recolectado en épocas próximas a las de su desarrollo normal, que en los que corresponden a etapas de pleno reposo. La realización de cultivos en medios carentes de aporte nitrogenado ha confirmado la notable influencia de las características originales del tubérculo. En los cultivos de tejidos de alta concentración nitrogenada y recolectados en una época de escasa disposición natural para el desarrollo al que se les fuerza, la influencia del medio es difícilmente apreciable en las primeras fases.

En el estudio del efecto de sustancias fitohormonales sobre la actividad enzimática, hemos podido comprobar que la leche de coco substituye perfectamente a las auxinas —ácidos indol y naftilacéticos—, lo que demuestra la eficacia de las sustancias activas que contiene. La adición de auxinas es imprescindible para la neoformación tisular de los tejidos normales cultivados *in vitro*. De acuerdo con ello, los fragmentos sembrados

en medios desprovistos de factores de crecimiento no han mostrado la menor variación en su capacidad descarboxilante.

Trabajando con *Scorzonera hispánica*, LIORET (10) ha podido comprobar que el glutamato sigue tres caminos fundamentales: formación de ácido málico a través del ciclo cítrico; producción de glutamina y descarboxilación a 4-AB. Pero la significación bioquímica de la glutamato descarboxilasa y el destino ulterior del 4-AB no están todavía precisados.

Como introducción a las posibilidades de un estudio comparativo con el tejido tumoral de *H. tuberosus*, hemos hallado que el tejido de *crown gall* cultivado *in vitro* posee también una notable actividad descarboxilante.

Los resultados obtenidos en el tubérculo *in vivo* y en el desarrollo *in vitro*, permiten establecer un claro paralelismo entre la descarboxilación del glutamato y la actividad metabólica celular. Por hallarse localizada preferentemente en semillas, rizomas, tubérculos, etc., puede sugerirse que su participación sea especialmente activa en algunas etapas de la vida vegetal.

Resumen

Se ha estudiado la evolución de la actividad descarboxilante del glutamato en el tubérculo de *Helianthus tuberosus in vivo* y en fragmentos tisulares desarrollados *in vitro*. Durante el período de letargo, los valores promedios de QCO₂ oscilan de 47 a 70, correspondiendo los niveles máximos al período intermedio. En la germinación del tubérculo la actividad se incrementa bruscamente. De acuerdo con este resultado, los fragmentos cultivados en el medio normal de nitratos experimentan una fuerte elevación de su actividad específica descarboxilante coincidiendo con la fase de mayor intensidad proliferativa. La evolución de la actividad en tejidos crecidos en medios que contenían monopéptidos como única fuente nitrogenada puede establecerse, en orden a su eficacia enzimática, del siguiente modo: arginina, arginina+4-aminobutirato, 4-aminobutirato y glutamato. Los valores promedios de los tres primeros superan a los obtenidos con el medio habitual de nitratos. De la comparación de las diversas series realizadas se deduce la existencia de variación estacional. La leche de coco sustituye perfectamente a las auxinas y la suplementación de ambas sustancias ejerce un ligero efecto aditivo. Los fragmentos sembrados en medios carentes de factores de crecimiento no han mostrado la menor variación en su capacidad descarboxilante. Los resultados obtenidos permiten establecer que la evolución enzimática se caracteriza por un fuerte incremento de actividad en las épocas de mayor intensidad metabólica.

Summary

L-glutamate 1-carboxylase in *Helianthus tuberosus* tissues grown in vitro

Helianthus tuberosus tuber has a high glutamate decarboxylase activity. The coenzyme — pyridoxal-5-phosphate — is

firmly bonded to the apoenzyme. In the rest period, the QCO_2 average values are in the range of 47-70, the highest levels being found among the winter samples. Germination involves a sudden increase of enzyme activity.

Like *in vivo*, the tissues grown *in vitro* in the normal nitrate medium showed a vigorous increase in its specific activity closely related with the period of more active growth. Enzyme evolution in the tissues grown in culture media containing amino acids as the only nitrogen supply, can be established as follows: arginine, arginine plus 4-aminobutyrate, 4-aminobutyrate and glutamate. Except for glutamate, the average values obtained with the added amino acids are higher than those of nitrate.

From the different assays carried out, the occurrence of seasonal changes can be inferred.

Cocconut milk efficiently replaces auxins in growth-promoting action. The fragments harvested from media without added growth factors had shown no increase in decarboxylating activity.

The obtained results indicate a general increase of glutamate 1-carboxylase activity in the steps of higher metabolic rate.

Bibliografía

- (1) BAZEMORE, A. y col.: *Nature*, **178**, 1052, 1956.
- (2) BESSMAN, S. P. y col.: *J. Biol. Chem.*, **201**, 385, 1953.
- (3) BOULANGER, P. y col.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **37**, 381, 1955.
- (4) CASCALES, M.: *Tesis Fac. Farm.* Madrid, 1961.
- (5) DENT, C. E.: *Biochem. J.*, **43**, 169, 1948.
- (6) DURANTON, H.: *Thèse Fac. Sciences*, París. Serie A, n.º 3255, 1959.
- (7) GAUTHERET, R. J.: *La culture des Tissus végétaux*. Mason Ed. París, 1959.
- (8) GONZÁLEZ, P. y col. (en prensa).
- (9) KOJIMA, K. y col.: *Nature*, **181**, 1200, 1958.
- (10) LIORET, C.: *Thèse Fac. Sciences*, París. Serie A, n.º 3542, 1960.
- (11) LOWRY, S. y col.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
- (12) MAYOR, F.: *An. Real Acad. Farm.*, **25/3**, 219, 1959.
- (13) MAYOR, F. y col.: *Rev. esp. Fisiol.*, **18/3**, 77 y 89, 1962.
- (14) MOREL, G. y DURANTON, H.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **40/12**, 2155, 1959.
- (15) ROBERTS, E. y col.: *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, **78**, 799, 1951.
- (16) ROBERTS, E. y col.: *J. Biol. Chem.*, **203**, 202, 1953.
- (17) SANTOS RUIZ, A. y MAYOR, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **16**, supl. 2, 65-102, 1960.
- (18) SCHALES, O. y SCHALES, M.: *Arch. Biochem.*, **11**, 155, 1946.
- (19) STEWARD, E. C. y col.: *Science*, **110**, 439, 1949.
- (20) SYNGE, R. L. M.: *Biochem. J.*, **48**, 429, 1951.
- (21) UDENFRIEND, S. y col.: *Ann. Rev. of Biochem.*, **29**, 215-219, 1960.
- (22) WESTALL, R. G. y col.: *Nature*, **165**, 617, 1950.

