

ACTIVIDAD QUITINOLITICA EN EXTRACTOS LIBRES DE CELULAS MICELIALES
DE Mucor rouxii *por Alicia Chagolla
Mario Pedraza y
Everardo Lopez Romero**CHITINOLYTIC ACTIVITY IN CELL-FREE EXTRACTS FROM MYCELIAL CELLS OF
Mucor rouxii

SUMMARY

Chitinase activity was demonstrated in the cytosol, a mixed membrane fraction and in the cell wall fraction from mycelium of M. rouxii. In all cases, chitinolytic activity was much more effective against nascent chitin than against preformed chitin. Results showed that loss of chitin biosynthesis upon incubation of a mixed membrane fraction at 28° C was not due to an increased depolymerization of the nascent polymer by endogenous chitinases. Incubation with digitonin extracted chitinase activity from cell walls but not from the mixed membrane fraction. The physiological implications of distribution of chitinase in different subcellular fractions of mycelial cells of M. rouxii remains to be established.

RESUMEN

Se detectó actividad de quitinasa en el citosol, en una fracción mixta de membranas y en la fracción de paredes celulares del micelio de M. rouxii. En todos los casos, la actividad quitinolítica fue mucho más efectiva contra quitina naciente que contra quitina preformada. Los resultados mostraron que la pérdida en la síntesis de la quitina cuando una fracción mixta de membranas se incubó a 28° C, no se debe a un aumento en la depolymerización del polímero naciente por quitinasas endógenas. La incubación con digitonina extrajo actividad de quitinasa de las paredes celulares, pero no de la fracción mixta de membranas. No se conocen aún las implicaciones fisiológicas de la distribución de actividad de quitinasa en las diferentes fracciones subcelulares del micelio de M. rouxii.

* Parte de éste trabajo se realizó con apoyo de la DIGICySA de la Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica, SEP y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

** Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato, Apartado Postal 187, Guanajuato, Gto., 36000 y Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

INTRODUCCION

Comúnmente se acepta que las enzimas líticas juegan un papel esencial en la elaboración de la pared celular, durante el crecimiento apical y la ramificación de las hifas de los hongos (Bartnicki-García, 1973; Gooday y Trinci, 1980). Esto implica que debe existir un balance muy delicado entre síntesis y lisis de la pared celular a fin de mantener un crecimiento ordenado de esta estructura (Bartnicki-García, 1973). Para mantener este balance, Bartnicki-García y Lippman (1969) propusieron que el gradiente de síntesis de pared en el domo apical de la hifa, es acompañado por un gradiente paralelo de actividad hidrolítica. Varias evidencias apoyan estas ideas (Bartnicki-García y Lippman, 1972a, 1972b; Rizvi y Robertson, 1965). Dado que la mayoría de los hongos contienen quitina como componente estructural mayoritario de la pared celular, la actividad de quitinasa debe jugar un papel morfogenético en estos organismos.

Varios informes en la literatura (Cohen, 1974; Zarahin-Herzberg y Arroyo-Begovich, 1983; Polacheck y Rosenberger, 1978; Elango *et al.*, 1982; Humphreys and Gooday, 1984), han descrito la presencia de actividad quitinolítica en diferentes fracciones subcelulares de hongos, pero pocos de ellos intentan explicar el papel de las quitinasas en la regulación de la biosíntesis de la quitina. La presencia de una substancia que bloqueaba la síntesis de quitina fué detectada en extractos libres de células de la forma micelial (McMurrough y Bartnicki-García, 1973) y levaduriforme de *M. rouxii* (López-Romero *et al.*, 1978). Estudios posteriores sobre el modo de acción de la proteína aislada de la forma de levadura, demostraron que se trataba de una quitinasa (López-Romero *et al.*, 1982). Recientemente hemos iniciado el estudio de la actividad de quitinasa en el micelio de *M. rouxii* con el objeto de entender su papel en el crecimiento de la pared celular de éste y otros hongos. Los resultados descritos en este trabajo corresponden a los enfoques iniciales de este problema.

MATERIALES Y METODOS

Organismo y condiciones de cultivo. La cepa de *Mucor rouxii*, IM-80 (ATCC 24905) se mantuvo en medio sólido de extracto de levadura peptona y glucosa (YPG) (Bartnicki-García y Nickerson, 1963). Las esporas del hongo se cosecharon a partir de cultivos de 4-6 días, mantenidos en botellas de Roux y se lavaron una vez por centrifugación con agua destilada estéril. Para la propagación del hongo, las esporas se inocularon en medio líquido de YPG (650 ml) en matraces Erlenmeyer de 2l, a una densidad celular final de 5×10^5 células/ml. Los matraces se agitaron en un baño de agua a 28°C durante 12-13 h bajo condiciones aeróbicas para inducir el desarrollo en forma micelial.

Preparación de los extractos libres de células. El micelio de *M. rouxii* se filtró a través de papel Whatman No. 1 y se lavó

con 200-300 ml de regulador de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 50 mM, pH 6.5 conteniendo MgCl_2 10 mM (regulador de Fosfato-magnesio o RFM). La suspensión celular se mezcló con 15 ml de perlas de vidrio (0.45-0.50 mm de diámetro) y el micelio se rompió en un homogenizador celular Braun MSK durante 45 seg. Durante el rompimiento, la temperatura se mantuvo alrededor de 2°C con una corriente de CO_2 líquido. El extracto total se centrifugó a 3000 x g (Rav) por 5 min para remover las paredes celulares. Estas se conservaron y el sobrenadante libre de paredes se centrifugó a 68,000 x g (Rav) durante 1 h; el sobrenadante (citosol) se conservó y el sedimento, una fracción mixta de membranas (FMM), se resuspendió en RFM y se mantuvo a 4°C.

Fraccionamiento del citosol con sulfato de amonio. Se agregó sulfato de amonio sólido al citosol hasta alcanzar 40% de saturación. La muestra se agitó suavemente durante 1 h a 4°C y el precipitado se colectó por centrifugación a 3000 x g (Rav) durante 10 min. Este se redisolvió en 6 ml de RFM y se dializó exhaustivamente contra el mismo regulador. A esta preparación se le designó como fracción P-40.

Extracción de las paredes celulares con digitonina. La fracción de paredes celulares se lavó 5-6 veces con RFM por centrifugación a 3000 x g (Rav) por 5 min y luego se trató con digitonina al 0.5% en RFM durante 1 h a 25°C. La mezcla de incubación se centrifugó a 3000 x g (Rav) por 5 min; el sedimento se descartó y el sobrenadante se centrifugó a 165,000 x g (Rav) durante 1 h. Se recuperó el sobrenadante y a esta preparación se le designó como extracto de digitonina de la pared celular (EDPC).

Determinaciones enzimáticas. a) Quitina sintetasa. La actividad de esta enzima se midió por el método de filtración descrito por Ruiz-Herrera y Bartnicki-García (1976) pero a pH 6.5 y en un volumen final de 100 µl. La quitina sintetasa zimogénica se activó con renilasa, una proteasa ácida de *Mucor miehei* (Novo enzyme Corporation, Mamaroneck, N.Y.). b) Quitinasa. La actividad de esta enzima se midió sobre quitina naciente o preformada como ya se ha descrito (López-Romero *et al.*, 1982). Cuando se midió la actividad quitinolítica de la FMM y de las paredes celulares sobre quitina naciente, se utilizó la actividad endógena de quitina sintetasa presente en estas preparaciones como fuente de quitina naciente. Para los ensayos con las fracciones P-40 y EDPC se utilizó una fuente exógena de quitina sintetasa, la cual se obtuvo tratando a la FMM con el detergente no iónico Brij-36 T en las condiciones descritas previamente (López-Romero *et al.*, 1978). En algunos experimentos se utilizó 3, 4-dinitrofenol-tetra-N-acetil-B-D-quitotetraosido (3, 4-DNP-TNAC) como sustrato cromogénico para medir actividad de quitinasa, como ha sido descrito por Humphreys and Gooday (1984), excepto que el regulador fue RFM.

Cromatografía en papel. Los productos de reacción de quitinasa y quitina sintetasa se analizaron por cromatografía descendente en papel utilizando como solvente una mezcla de alcohol isoamílico: piridina:agua (1:1:0.8, v/v) como ya se describió (López-Romero *et al.*, 1982).

Miscelaneo. El contenido de proteína en las diferentes preparaciones se determinó por el método de Lowry, et al., 1951.

RESULTADOS

Actividad quitinolítica del citosol

Cuando se agregaron cantidades variables de la fracción P-40 del citosol a los ensayos de quitina sintetasa, se observó la hidrólisis del polímero naciente como una función de la concentración de P-40 (Fig. 1A). La misma preparación de quitinasa también degradó al sustrato cromogénico 3,4-DNF-TNAC; la liberación de 3,4-dinitrofenol aumentó en función del tiempo de incubación durante las primeras dos horas y luego permaneció constante (Fig. 1B). Como ya se había observado para las células levaduriformes de M. rouxii (López-Romero et al., 1982), la quitinasa del citosol de la forma micelial fue mucho más efectiva contra quitina naciente que contra quitina preformada. Con el propósito de optimizar las condiciones de ensayo sobre quitina preformada, se probó el efecto de la temperatura y del pH sobre la actividad de quitinasa de la fracción P-40, utilizando los ensayos radiactivo y cromogénico, respectivamente. La máxima degradación de la quitina preformada (5.6% después de 2.5 h) se obtuvo a 28°C; hidrólisis de 3.6% y 1.4% se observaron a 20°C y a 37°C, respectivamente. Por arriba de 40°C, la actividad quitinolítica fue casi nula. El pH óptimo para la actividad de quitinasa, ensayada sobre el derivado fenólico, fue de 6.5. Aun en las condiciones óptimas de temperatura y pH, la hidrólisis de la quitina preformada por la fracción P-40 nunca excedió el 5-6% de un total de aproximadamente 8600 dpm del sustrato radiactivo.

Actividad quitinolítica de la FMM

El análisis por cromatografía en papel de los productos formados cuando la FMM se incubó con el sustrato y los activadores de la quitina sintetasa, reveló la presencia de cantidades substanciales de diacetilquitobiosa (DAQ) y N-acetilglucosamina (N-AcGlcN). Como se muestra en la Tabla 1, la suma de ambos productos representó el 34.5% de la quitina sintetizada por la FMM. En la misma Tabla puede observarse la pobre actividad quitinolítica de la misma fracción membranal sobre el polisacárido pre-sintetizado (solamente el 0.6% de hidrólisis después de 8 h de incubación).

La inestabilidad de la quitina sintetasa en extractos crudos no se debe a la destrucción del polímero naciente por quitinasas endógenas

Una diferencia muy marcada entre la quitina sintetasa cruda de las formas de levadura y micelio de M. rouxii es la extraordinaria inestabilidad de ésta última (Ruiz-Herrera y Bartnicki-García, 1976). La pérdida del 80-90% de la actividad de la enzima micelial después de 30-60 min a 28°C ha sido atribuida por estos autores a la presencia de proteasas endógenas. Sin embargo, nosotros consideramos la posibilidad de que este comportamiento no fuese debido a la preteolisis de la sintetasa en sí, sino a un aumento de la depolimerización in situ de la quitina naciente por quitinasas endógenas. Por ello, determinamos

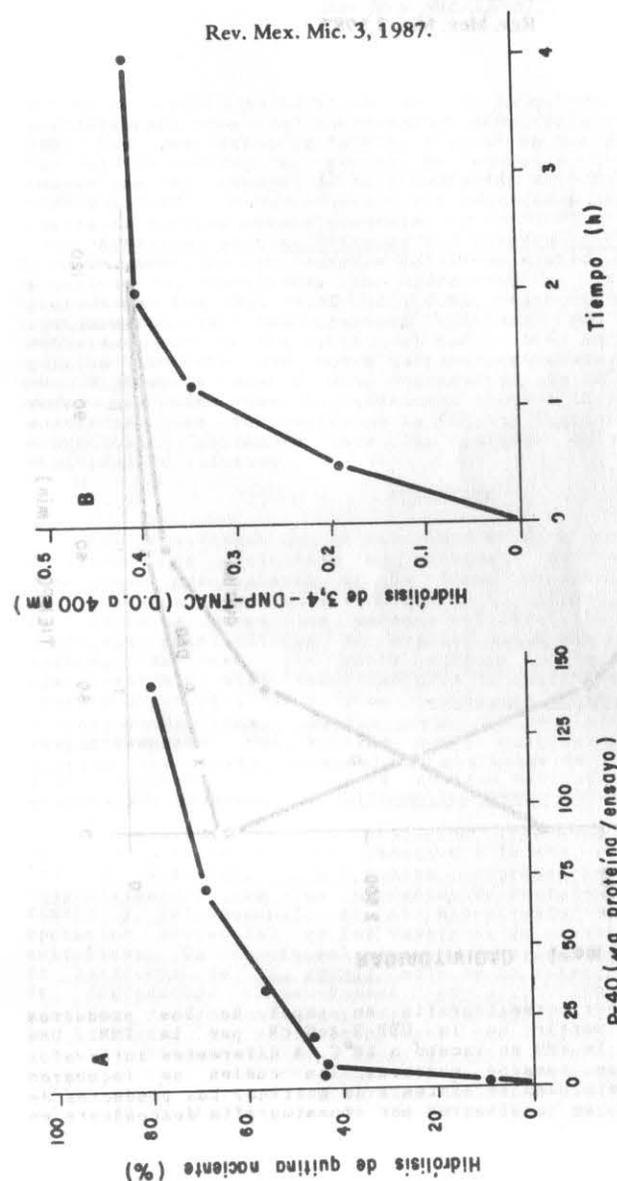


Fig. 1 Hidrólisis de quitina naciente (A) y del cromógeno 3,4-DNP-TNAC (B) por la quitinasa de una fracción P-40. En A, se midió la quitina sintetizada durante una hora, en presencia de cantidades variables de la fracción P-40. En B, se midió la hidrólisis del sustrato 3,4-DNP-TNAC por una fracción P-40 (3.3 mg de proteína) a diferentes intervalos de tiempo.

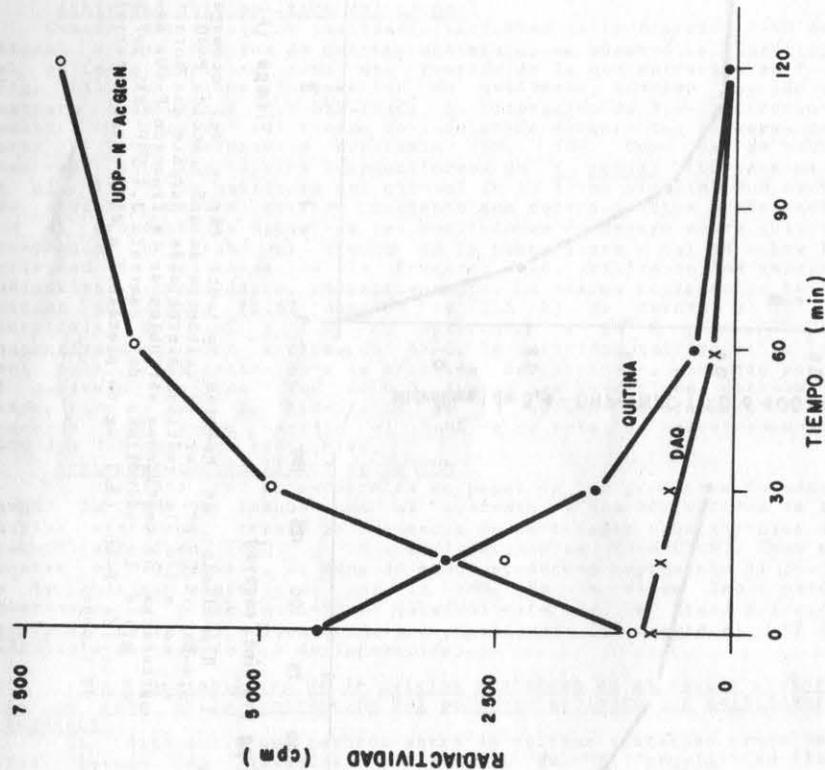


Fig. 2. Análisis por cromatografía en papel de los productos formados a partir de la UDP-N-AcGlcN por la FMM. Una alícuota de la FMM se incubó a 28°C. A diferentes intervalos de tiempo se tomaron muestras, las cuales se incubaron durante 30 min. para la síntesis de quitina. Los productos de la reacción se analizaron por cromatografía descendente en papel.

si el decremento de la biosíntesis de la quitina por la FMM ocurría paralelamente con un incremento concomitante en la acumulación de DAO. Los resultados de la Fig. 2 muestran que éste no fue el caso. Por el contrario, el perfil de síntesis de la quitina fue una imagen en el espejo de la acumulación de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-N-AcGlcN). Solo se detectaron cantidades significativas de DAO cuando la quitina estaba presente.

Actividad quitinolítica de las paredes celulares

La fracción de paredes celulares mostró niveles muy bajos de actividad quitinolítica. La hidrólisis de la quitina naciente y preformada fue del 5.5% y del 0.6%, respectivamente (Tabla 2). El tratamiento de las paredes celulares con digitonina liberó actividad quitinolítica, la cual fue también mucho más activa sobre quitina naciente que sobre quitina preformada. La enzima extraída con digitonina mostró una degradación de la quitina naciente 10 veces más alta que la quitinasa unida a la pared (resultados no mostrados). La incubación de la FMM con digitonina bajo las mismas condiciones empleadas para las paredes celulares, no extrajo actividad de quitinasa.

DISCUSION

Los resultados que se describen en éste trabajo indican que la actividad de quitinasa se encuentra asociada con diferentes fracciones subcelulares en la forma micelial de *M. rouxii*. Se demostró actividad quitinolítica en el citosol, una fracción mixta de membranas y en las paredes celulares. En todos los casos, la actividad quitinolítica se expresó mucho más eficientemente sobre quitina naciente que sobre quitina preformada. Observaciones similares han sido descritas para la quitinasa de germen de tripo (Molano *et al.*, 1979) y en *Neurospora crassa* (Zarahin-Herzberg y Arroyo-Begovich, 1983), las cuales fueron 2 y 4 veces, respectivamente, más activas sobre quitina naciente que sobre quitina preformada. Asimismo, la quitinasa de *Serratia marcescens* fue altamente activa contra quitina naciente sintetizada por una preparación membranal de *Schizophyllum commune* (Vermeulen y Wessels, 1986).

El análisis de los productos liberados a partir de quitina naciente por la quitina asociada a la FMM, reveló la presencia de DAO y N-AcGlcN, las cuales representaron 27.1% y 7.3%, respectivamente, de los productos de degradación. La detección del dímero y del monómero en el hidrolizado indican claramente la operación secuencial en las membranas de actividades de quitinasa y quitobiasa. En el citosol y en preparaciones más puras de quitinasa de levaduras de *M. rouxii* solo se ha detectado DAO como producto de degradación (Lopez-Romero *et al.*, 1982). De acuerdo con nuestros resultados, Humphreys y Gooday (1984) detectaron actividad de quitinasa en un sobrenadante de 100,000 x g (Rav) y en una fracción microsomal de *Mucor mucedo*; ésta última, pero no la del sobrenadante pudo ser activada por proteólisis y requirió de fosfolípidos para su actividad. Habiendo observado la considerable actividad quitinolítica de la FMM, era de interés determinar si la

bien conocida inestabilidad de la quitina sintetasa cruda de *M. rouxii* era debida a la inactivación de la enzima o a un aumento de la destrucción *in situ* del polímero naciente por quitinasas endógenas. Los resultados obtenidos apoyaron la primera idea, aunque las quitinasas endógenas interfieren en los ensayos de quitina sintetasa, el decremento en la quitina biosintetizada por la FMM se debe indudablemente a inactivación de la sintetasa.

La actividad hidrolítica de las paredes celulares nativas sobre quitina naciente fue muy pobre comparada con la que mostró la fracción extraída con digitonina. Se ha demostrado que la quitina sintetizada en presencia de la saponina es muy susceptible a la degradación por quitinasa (López-Romero *et al.*, 1982; Vermeulen y Wessels, 1986). A este respecto, Vermeulen y Wessels (1986) demostraron que la digitonina y el abrillantador Calcofluor Blanco inhiben la cristalización de la quitina, produciendo cadenas libres, no cristalinas, las cuales son extraordinariamente susceptibles a la quitinolisis.

Las implicaciones fisiológicas de la múltiple distribución de la actividad de quitinasa en el micelio de *M. rouxii* y su correlación funcional quedan por establecerse. La observación de que la quitinasa microsomal y la quitina sintetasa de *M. mucedo* comparten dos propiedades: zimogenidad y requerimiento por fosfolípidos, condujo a Humphreys y Gooday (1984) a proponer que

Tabla 1. Actividad quitinolítica de la FMM sobre quitina naciente (Experimento A) y quitina preformada (Experimento B)

Experimento	Productos recuperados (cpm)				Hidrólisis (%)
	Quitina	UDP-N-AcGlcN	DAQ	N-AcGlcN	
A	2187	636	908	244	134.5
B	Radiactividad solubilizada (cpm)				Hidrólisis (%) (después de 8h)
	Adición	3 h	8 h		
	RFM	93	93		---
2	Quitinasa de				Hidrólisis (%)
	Streptomyces	625	1578		
	FMM	110	146		30.6

A. La FMM se adicionó a mezclas de quitina sintetasa. Después de 2 h a temperatura ambiente, los productos formados se analizaron por cromatografía descendente en papel.

B. Una alícuota (8600 cpm) de quitina radiactiva (marcada con ^{14}C) se mezcló con RFM, una quitinasa comercial o FMM y la hidrólisis de la quitina preformada se midió después de 3 y 8 h de incubación.

¹ Calculado con la formula: $\frac{908 + 244}{2187 + 908 + 244} \times 100$

² Obtenida de Calbiochem; 50 ug/ensayo.

³ Valor corregido para la radiactividad liberada por el control (93 cpm)

estas enzimas podrían estar co-reguladas durante la extensión apical, por un mecanismo aún no aclarado. En *N. crassa*, Zarahin-Herzberg y Arroyo-Begovich (1983) observaron que la actividad de quitinasa se localizaba principalmente en el citosol (55%) y en las paredes celulares (30%) con poca actividad en la fracción membranal. Polacheck y Rosenberger (1978) detectaron actividad de quitinasa en paredes celulares de *Aspergillus nidulans* y propusieron que ésta podría provenir de vesículas citoplásmicas conteniendo quitinasa las cuales podrían quedar atrapadas en la pared recientemente formada de la hifa en crecimiento. Se requerirá de más estudios para asignar una función particular a las quitinasas de *M. rouxii* y otros hongos.

Tabla 2. Actividad quitinolítica de la fracción de paredes celulares sobre quitina naciente (Experimento A) y quitina preformada (Experimento B)

Experimento	Productos recuperados (cpm)			Hidrólisis (%)
	Quitina	UDP-N-AcGlcN	DAQ	
A	2085	1838	123	15.5
B	Radiactividad solubilizada (cpm)			Hidrólisis (%) (después de 8h)
	Adición	3 h	8 h	
	RFM	93	93	---
	Quitinasa de			
	Streptomyces	625	1578	18.3
	Paredes celulares	129	150	0.6

Misma leyenda que en la Tabla 1 excepto que se usó la fracción de paredes celulares en lugar de la FMM.

¹ Calculado con la formula: $\frac{123}{2085 + 123} \times 100$

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. José Rufz-Herrera por la revisión crítica del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Bartnicki-García, S., 1973. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 23: 245-267.
- Bartnicki-García, S. y W.J. Nickerson, 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* 84: 841-858.
- Bartnicki-García, S. y E. Lippman, 1969. Fungal morphogenesis: cell wall construction in *Mucor rouxii*. *Science* 165: 302-304.
- Bartnicki-García, S. y E. Lippman, 1972a. Inhibition of *Mucor rouxii* by Polyoxin D: Effects on chitin synthetase and morphological development. *J. Gen. Microbiol.* 71: 301-309.

- Bartnicki-García, S. y E. Lippman, 1972b. The bursting tendency of hyphal tips of fungi; presumptive evidence for a delicate balance between wall synthesis and wall lysis in apical growth. *J. Gen. Microbiol.* 73: 487-500.
- Cohen, R.J., 1974. Some properties of chitinase from *Phycomyces blakesleeana*. *Life Sci.* 15: 289-300.
- Elango, N., J.U. Correa y E. Cabib, 1982. Secretory character of yeast chitinase. *J. Biol. Chem.* 257: 1398-1400.
- Gooday, G.W. y A.P.J. Trinci, 1980. Wall structure and biosynthesis in fungi. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 30: 207-251.
- Humphreys, A.M. y G.W. Gooday, 1984. Properties of chitinase activities from *Mucor mucedo*: evidence for a membrane-bound zymogenic form. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1359-1366.
- López-Romero, E., J. Rufz-Herrera y S. Bartnicki-García, 1978. Purification and properties of an inhibitory protein of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *Biochem. Biophys. Acta* 525: 338-345.
- López-Romero, E., J. Rufz-Herrera y S. Bartnicki-García, 1982. The inhibitory protein of chitin synthetase from *Mucor rouxii* is a chitinase. *Biochim. Biophys. Acta* 702: 233-236.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Mc. Murrough, I. y S. Bartnicki-García, 1973. Inhibition and activation of chitin synthesis by *Mucor rouxii* cell extracts. *Arch. Biochem. Biophys.* 158: 812-816.
- Molano, J., I. Polacheck, A. Duran y E. Cabib, 1979. An endochitinase from wheat germ. *J. Biol. Chem.* 254: 4901-4907.
- Polacheck, I. y R.F. Rosenberber, 1978. Distribution of autolysins in hyphae of *Aspergillus nidulans*: evidence for a lipid-mediated attachment to hyphal walls. *J. Bacteriol.* 135: 741-747.
- Rizvi, S.R.H. y N.F. Robertson, 1965. Apical disintegration of hyphae of *Neurospora crassa* as a response to L- sorbose. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 48: 469-477.
- Rufz-Herrera, J. y S. Bartnicki-García, 1976. Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 97: 241-249.
- Vermeulen, C.A. y J.G.H. Wessels, 1986. Chitin biosynthesis by a fungal membrane preparation. Evidence for a transient non-crystalline state of chitin. *Eur. J. Biochem.* 158: 411-415.
- Zarahin-Herzberg, A. y A. Arroyo-Begovich, 1983. Chitinolytic activity from *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 3319-3326.