

ESTUDIO DE UNA FRACCION PROTEOLITICA DE *Mucor rouxii* QUE INACTIVA A LA QUITINA SINTETASA*

por Martha B. Alvarado,**
Mario Pedraza** y
Everardo López-Romero***, ***

STUDY OF A PROTEOLYTIC FRACTION FROM *Mucor rouxii* THAT INACTIVATES CHITIN SYNTHETASE

SUMMARY

In this communication we describe the partial purification of a proteolytic fraction from *Mucor rouxii* (mycelium) that strongly inactivates chitin synthetase. It was isolated following fractionation of the cytosol with ammonium sulfate and chromatography of the resulting fraction in a column of Bio-Gel P-100. The fraction with proteolytic activity, which was recovered in the void volume of the column, inactivated chitin synthetase directly in a manner dependent on the concentration and the time of exposure to it. Both crude and purified preparations of chitin synthetase from the mycelial form of the fungus were markedly more sensitive to the inactivating fraction than the corresponding preparations obtained from the yeast-like form.

RESUMEN

En este trabajo describimos la identificación y purificación parcial de una fracción proteolítica obtenida de *Mucor rouxii* (micelio) que inactiva fuertemente a la quitina sintetasa. Ella fue aislada después de fraccionar el citosol con sulfato de amonio y someter a la fracción resultante a cromatografía en una columna de Bio-Gel P-100. La fracción con actividad proteolítica, la cual se recuperó en el volumen de exclusión de la columna, inactivó directamente a la quitina sintetasa de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición a la misma. Tanto las

- * Parte de este 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, Apdo. Postal 187, Guanajuato, Gto. 36000, México.
- *** Departamento de Genética y Biología Molecular, CINVESTAV del IPN, Apartado Postal 14-740, CP 07000 México, D.F., México.

preparaciones crudas como purificadas de quitina sintetasa de la forma micelial del hongo fueron marcadamente más sensibles a la fracción inactivante que las preparaciones correspondientes obtenidas a partir de la forma de levadura.

INTRODUCCIÓN

Aún cuando la activación *in vitro* de la quitina sintetasa zimógena por proteasas de diferente origen es un fenómeno bien documentado (Cabib, 1981; Ruiz-Herrera, 1982), la regulación de la enzima *in vivo* por un mecanismo proteolítico es aún tema de especulación. El papel de las proteasas endógenas *in vivo* como moduladores de la quitina sintetasa fue postulado por Cabib y colaboradores, quienes aislaron una proteasa neutra (la proteinasa B) a partir de especies de *Saccharomyces*, la cual activaba a la enzima de la levadura (Cabib y Ulane, 1973, 1974). Dicho postulado fue cuestionado cuando independientemente Wolf y Ehman (1978) y Zubenko *et al.* (1979) aislaron mutantes de *Saccharomyces* carentes en proteinasa B. Los cuales mostraban un ciclo normal de desarrollo. Campbell y Peberdy (1979) aislaron una proteasa neutra a partir de *Aspergillus nidulans* que activaba a la quitina sintetasa más eficientemente que la tripsina. Ruiz-Herrera y Bartnicki-García (1976) observaron que las preparaciones crudas de quitina sintetasa obtenidas de la forma de levadura de *M. rouxii* se activaban lentamente, en tanto que la enzima de la forma filamentosa del hongo se inactivaba rápidamente cuando se incubaban a temperatura ambiente. De acuerdo con estos autores, la diferencia entre las dos preparaciones de quitina sintetasa podría reflejar la operación de proteasas endógenas. Ruiz-Herrera (1984) ha sugerido que la quitina sintetasa en el ápice de la hifa en crecimiento debería inactivarse rápidamente con objeto de garantizar la extensión apical durante el desarrollo filamentoso de los hongos. Recientemente, Díaz y Ruiz-Herrera (1987) aislaron una proteasa ácida de bajo peso molecular (16,000 daltones) a partir de la forma micelial de *M. rouxii*, la cual inactiva a la quitina sintetasa. En el mismo organismo, hemos detectado y purificado parcialmente una fracción proteolítica distinta que también inactiva a la quitina sintetasa. Decidimos analizar la inactivación de la quitina sintetasa por esta preparación endógena como un enfoque preliminar al objetivo a largo plazo de entender el papel de estas enzimas en la regulación de la quitina sintetasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Organismo y condiciones de cultivo. Para el desarrollo del presente trabajo se utilizó la cepa de *Mucor rouxii* IM-80 (ATCC 24905) la cual se mantuvo en medio sólido conteniendo extracto de levadura, peptona y glucosa (ELPG) (Bartnicki-García y Nickerson,

1962). 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 organismo, las esporas se inocularon en matraces Erlenmeyer de 2 l conteniendo 650 ml de medio líquido de ELPG a una densidad celular de 5×10^5 esporas/ml. Los matraces se agitaron a 120 rpm en un baño de agua a 28°C durante 10 h en aerobiosis para obtener la forma filamentosa, o durante 12-13 h en condiciones anaeróbicas y bajo una atmósfera de $N_2:CO_2$ (70:30, v/v) para inducir el crecimiento en forma de levadura.

Obtención de los extractos libres de células. El micelio de *M. rouxii* se cosechó por filtración al vacío a través de papel Whatman No. 1, se lavó con 500-600 ml de regulador de $KH_2PO_4/NaOH$ 50 mM de pH 6.5 el cual contenía $MgCl_2$ 10 mM (regulador de fosfatos magnesio o RFM) y se resuspendió en el mismo regulador. En el caso de la levadura, las células se cosecharon por filtración al vacío utilizando un sistema Millipore equipado con un filtro tipo SM de 5.0 μm . Al paquete celular se le agregaron cantidades suficientes de regulador de $KH_2PO_4/NaOH$ 1 M, pH 6.5, $MgCl_2$ 1 M y sacarosa al 50% para obtener concentraciones finales de 50 mM, 10 mM y 10%, respectivamente. Las células miceliales o levaduriformes se mezclaron con perlas de vidrio (0.45-0.5 mm de diámetro) en una botella de Durán y se rompieron durante 60 seg en un homogeneizador celular Braun, Mod. MSK, enfriado con una corriente presurizada de CO_2 . El homogenado se centrifugó durante 5 min a 6500 x g (Rav) para eliminar las paredes celulares. El extracto libre de paredes se centrifugó durante 60 min a 68000 x g (micelio) o durante 45 min a 54000 x g (levadura); el sedimento, correspondiente a una fracción mixta de membranas se descartó y en cada caso, el sobrenadante designado como citosol, se recuperó y se conservó a 4°C.

Purificación parcial de la fracción con actividad proteolítica que inactiva a la quitina sintetasa (fracción inactivante de la quitina sintetasa o FIQS). a) Fraccionamiento salino. El citosol obtenido de la forma micelial como ya se ha descrito, se fraccionó con sulfato de amonio agregando lentamente la sal sólida hasta alcanzar el 60% de saturación. La muestra se agitó suavemente a 2-4°C y después de 1 h la proteína precipitada se recuperó por centrifugación a 10,000 x g durante 15 min y se resuspendió en 6-8 ml de RFM. Al extracto obtenido de esta forma se le llamó fracción P-60. b) Cromatografía de exclusión molecular en una columna de Bio-Gel P-100. La fracción P-60 se sometió a cromatografía en una columna de Bio-Gel P-100 (Bio-Rad Labs, Richmond, CA) de 2 x 130 cm equilibrada con RFM conteniendo 0.02% de azida de sodio. La muestra se eluyó con el mismo regulador y se recolectaron fracciones de 5 ml. A las fracciones que eluyeron en el volumen de exclusión (Vo) de la columna se les midió su capacidad para inactivar a la quitina sintetasa como se describe más adelante.

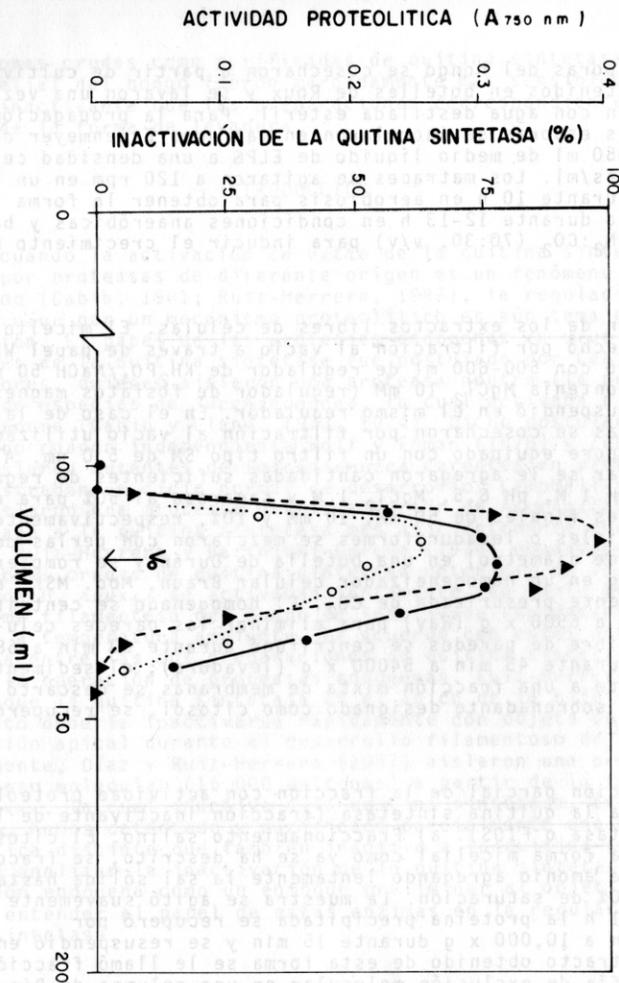


Fig. 1. Purificación de la fracción inactivante de la quitina sintética de *M. rouxii* por cromatografía de exclusión molecular. La fracción P-60 del citosol se sometió a cromatografía en una columna de Bio-Gel P-60 como se describió en materiales y métodos. En las fracciones indicadas se determinaron la capacidad para inactivar a la quitina sintética cruda de la forma micelial (●) y la

Obtención de diferentes preparaciones de quitina sintética. 1) Preparaciones crudas de las formas de micelio y levadura. Aproximadamente 6-8 ml del citosol, obtenido como ya se describió, se sometieron a cromatografía en una columna de Bio-Gel A-5m de 2 x 28 cm equilibrada con RFM. La muestra se eluyó con el mismo regulador y se recolectaron fracciones de 3 ml. En estas condiciones, la actividad de quitina sintética eluye en las fracciones del volumen de exclusión de la columna. Después de medir dicha actividad como se describe más adelante, la fracción más activa se utilizó como preparación cruda de quitina sintética. 2) Purificación de quitosomas. Los quitosomas se purificaron a partir de las preparaciones crudas de quitina sintética por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa siguiendo la metodología descrita por Martínez-Cadena et al. (1987) para los de la forma micelial y aquella descrita por Ruiz-Herrera et al. (1984) para los quitosomas de la forma de levadura. 3) Preparaciones de quitina sintética preactivada. En algunos experimentos se utilizó quitina sintética preactivada tanto de micelio como de levadura, para lo cual 1.6 ml de la preparación de quitina sintética cruda se incubaron con renilasa (una proteasa ácida de *Mucor miehei*; Novo Enzyme Corporation, Mamaroneck, NY) a una concentración final de 4 mg/ml en RFM. Después de 30-60 min de incubación a temperatura ambiente, la acción proteolítica de la renilasa se detuvo agregando 50 μ l (50 μ g) del inhibidor de proteasas ácidas, la pepstatina A. La muestra activada se sometió a cromatografía en una columna de Bio-Gel A-5m de 1 x 17 cm equilibrada con RFM. La muestra se eluyó con el mismo regulador y se recolectaron fracciones de 1 ml. La fracción con mayor actividad de quitina sintética asociada al volumen de exclusión de la columna se utilizó como fuente de la enzima preactivada.

Determinaciones enzimáticas. a) Quitina sintética. La actividad de esta enzima se midió en copas desechables de poliestireno. La mezcla de incubación contenía, en un volumen total de 50 μ l: 30 μ l (45-75 μ g de proteína) de la preparación de quitina sintética, 10 μ l (200 μ g) de renilasa y 10 μ l de una mezcla de reacción conteniendo UDP-¹⁴C-N-acetilglucosamina 2 mM (act. esp., 0.25 Ci/mol), N-acetilglucosamina 100 mM y ATP 2 mM en RFM. Cuando se usó quitina sintética preactivada, la renilasa se excluyó de la mezcla de reacción. Después de incubar durante 30 ó 60 min a temperatura ambiente y en la oscuridad, se añadieron 25-50 μ l de ácido acético glacial para detener la reacción. La radiactividad incorporada en la quitina se determinó por el método de filtración descrito por Ruiz-Herrera y Bartnicki-García (1976). b) Inactivación de la quitina sintética por la FIQS. Para medir dicho efecto, rutinariamente se agregaron alícuotas de 10 μ l (50-100 μ g de proteína) de las preparaciones de FIQS a mezclas de reacción de quitina sintética preparadas como ya se describió. El decremento en la radiactividad incorporada en la quitina, comparado con un control sin FIQS, se tomó como una medida de la actividad de la misma. c) Actividad proteolítica de la FIQS. Esta se midió utilizando dos tipos de sustrato: caseína al 0.5% en regulador de KH₂PO₄ 100 mM, pH 6.5, conteniendo MgCl₂ 10

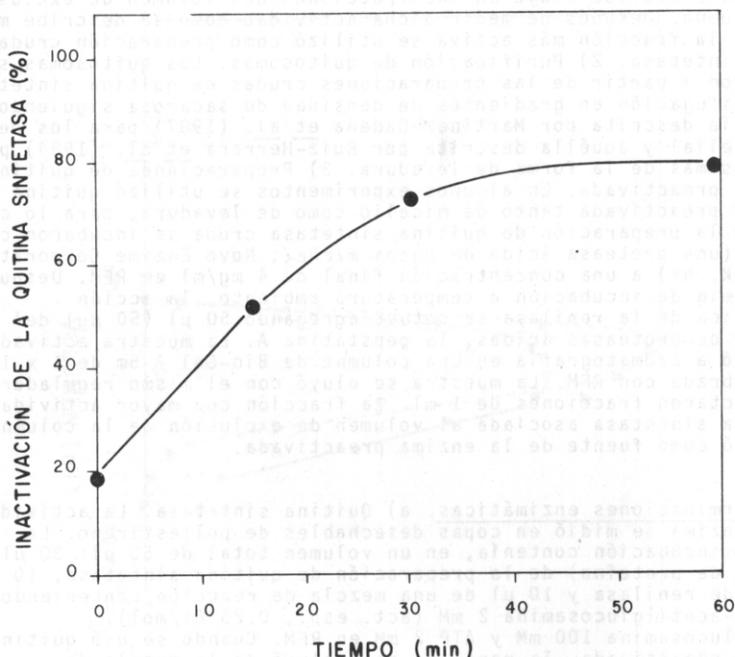


Fig. 2. Inactivación de la quitina sintetasa en función del tiempo de incubación con FIQS. Alícuotas de 200 μ l de una preparación de quitina sintetasa cruda preactivada de la forma micelial se incubaron a temperatura ambiente con 50 μ l (470 μ g de proteína) de FIQS o de RFM (control). A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de cada mezcla en las cuales se ensayó la actividad de quitina sintetasa como se describe en materiales y métodos. El porcentaje de inactivación para cada tiempo se calculó tomando como referencia los valores de actividad en la mezcla control. Dichos valores no variaron significativamente durante el tiempo que duró el experimento.

mM y hemoglobina desnaturalizada por el método de Schlamowitz y Peterson (1959) al 0.5% en regulador de H_3PO_4/KH_2PO_4 100 mM, pH 3.5, conteniendo $MgCl_2$ 10 mM. Se mezclaron 1.8 ml de uno u otro sustrato con 0.2 ml de la preparación de FIQS y la mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente; se añadieron 2 ml de ácido tricloroacético al 5%, se dejó en reposo durante 1 h a 4°C y se centrifugó 5 min a 2600 x g. La liberación de péptidos se midió por el método de Lowry et al. (1951) modificado por McDonald y Chen (1965), en alícuotas de 1.0 ml del sobrenadante.

Determinación de proteína. El contenido de proteína en las diferentes preparaciones se midió por el método de Lowry et al. (1951).

RESULTADOS

Un paso en el procedimiento que hemos establecido para purificar quitinasas a partir de la forma micelial de *M. rouxii* consiste en fraccionar el citosol del hongo con sulfato de amonio al 60% de saturación. La fracción resultante (P-60) es sometida luego a cromatografía de exclusión molecular en una columna de Bio-Gel P-100 (Pedraza-Reyes y López-Romero, 1989). Cuando la fracción P-60 se sometió a dicho tratamiento, observamos que las fracciones correspondientes al volumen de exclusión (V_o) de la columna inactivaban fuertemente a la quitina sintetasa. Paralelos al pico de inactivación de la quitina sintetasa, detectamos otros de actividad proteolítica sobre dos sustratos: caseína y hemoglobina. Estos resultados se muestran en la figura 1, donde se observa que la hidrólisis de la caseína fue significativamente mayor que la de la hemoglobina. Las fracciones de los picos no mostraron actividad quitinolítica cuando ésta se ensayó sobre quitina naciente como ya se ha descrito (Chagolla et al., 1987; Pedraza-Reyes y López-Romero, 1989) (resultados no mostrados).

Dado que la actividad de quitina sintetasa se ensaya rutinariamente en presencia de una proteasa exógena necesaria para activarla, se consideró la posibilidad de que la fracción inactivante de la quitina sintetasa detectada en este trabajo interfiriese con la actividad de aquella impidiendo de esta manera la activación del zimógeno. Los resultados mostrados en la tabla 1 indican que la FIQS produjo niveles comparables de inactivación de la quitina sintetasa independientemente de que ésta no se activara exógenamente (actividad basal) o se activara antes o durante el ensayo con renilasa. Con el objeto de analizar la cinética de inactivación, preparaciones de quitina sintetasa se preincubaron con la FIQS durante diferentes intervalos. Luego se agregó el sustrato y demás ingredientes de la

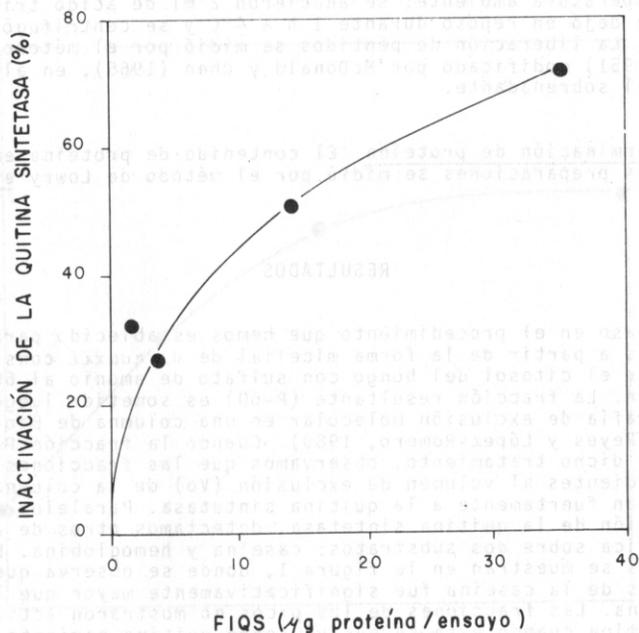


Fig. 3. Inactivación de la quitina sintetasa en función de concentraciones variables de FIQS. La actividad de quitina sintetasa en una preparación cruda obtenida de la forma micelial se midió en presencia de cantidades crecientes de FIQS, como se describe en materiales y métodos.

mezcla de reacción de quitina sintetasa y la biosíntesis del polímero se dejó transcurrir durante 30 min. Los resultados mostrados en la figura 2 indican que la inactivación de la quitina sintetasa por la FIQS fue una función del tiempo de exposición a esta. Cuando se agregaron cantidades variables de FIQS a mezclas estándar de ensayo de quitina sintetasa, la curva dosis-respuesta obtenida indicó que la inactivación de la enzima es también una función dependiente de la concentración de FIQS (Fig. 3).

Una observación relevante se hizo cuando la inactivación por FIQS se analizó utilizando diferentes preparaciones de quitina sintetasa. Los resultados mostrados en la figura 4 indican que tanto las preparaciones crudas como purificadas de quitina sintetasa de la fase micelial del hongo fueron marcadamente más sensibles a la inactivación que las preparaciones equivalentes obtenidas de la forma de levadura.

DISCUSION

En este trabajo se describen la identificación y la purificación parcial de una fracción con actividad proteolítica obtenida de la forma micelial de *M. rouxii* que inactiva a la quitina sintetasa. De acuerdo con su comportamiento en la columna de Bio-Gel P-100, dicha preparación es distinta a la proteasa ácida de bajo peso molecular purificada a partir del mismo organismo por Díaz y Ruiz-Herrera (1987), y que también inactiva a la quitina sintetasa. Aunque no hemos hecho experimentos para determinar su pH óptimo de actividad, la FIQS mostró mayor actividad sobre caseína, ensayada a pH 6.5, que sobre hemoglobina, ensayada a pH 3.5. La observación de que la FIQS actúa similarmente sobre quitina sintetasa no activada con proteasa exógena o activada antes o durante el ensayo con renilasa, descarta la posibilidad de que el mecanismo de inactivación sea indirecto e indica que la acción proteolítica de la FIQS se ejerce directamente sobre la quitina sintetasa. Además, la inactivación de dicha enzima fue una función tanto de la concentración como del tiempo de exposición a la FIQS.

Interesantemente, las preparaciones de quitina sintetasa obtenidas de la forma micelial del hongo fueron más sensibles a la inactivación por FIQS que las preparaciones equivalentes obtenidas de la forma de levadura. Estos resultados podrían interpretarse de tres maneras. 1) Debido a su estructura, la quitina sintetasa de la forma micelial sería más sensible a la acción de la FIQS que la de la forma de levadura. 2) La diferencia en sensibilidad a la FIQS no radica en la quitina sintetasa *per se* sino en el distinto entorno que rodea a la enzima en las dos preparaciones. En otras palabras, las

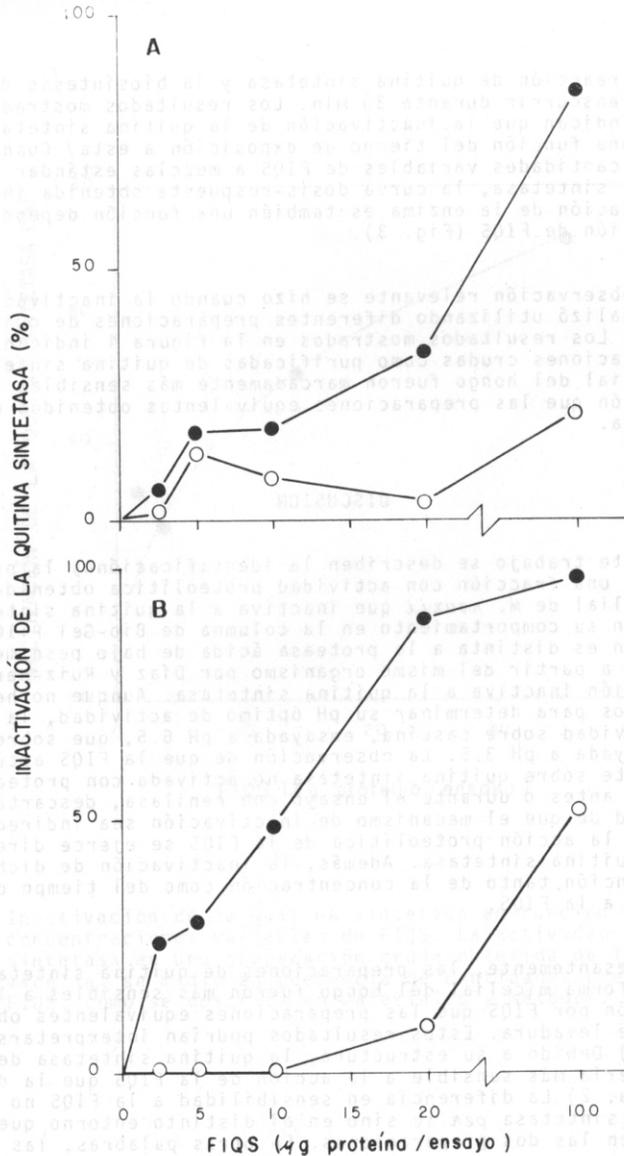


Fig. 4. Efecto de FIQS sobre diferentes preparaciones de quitina sintetas. La actividad de quitina sintetas en preparaciones preactivadas crudas (A) y quitosomales (B) obtenidas de las formas de micelio (●) y levadura (○) se midió durante 60 min en presencia de cantidades variables de FIQS, como se describe en materiales y métodos.

preparaciones obtenidas del micelio poseerían un factor adicional que amplificaría el efecto de FIQS. Dicho factor podría ser una segunda proteasa que al activarse por FIQS aceleraría la inactivación de la quitina sintetas. Esta posibilidad es bastante razonable si se considera que la regulación de muchos fenómenos biológicos por proteólisis limitada ocurre por un mecanismo de cascada (Wolf, 1980; Neurath, 1984). 3) Una tercera posibilidad es que al agregar FIQS a las preparaciones miceliales simplemente se acelere un proceso de inactivación de la quitina sintetas que ya se habría iniciado durante el rompimiento de las células y/o la posterior manipulación de las muestras. Esta interpretación sería consistente con las observaciones de Ruiz-Herrera y Bartnicki-García (1976) en el sentido de que las preparaciones de quitina sintetas miceliales se inactivan mucho más rápido que las de la levadura.

Nuestros resultados y los de Díaz y Ruiz-Herrera (1987) indican que las células miceliales de *M. rouxii* (y presumiblemente también las levaduriformes) poseen diferentes proteasas capaces de inactivar a la quitina sintetas. Queda por establecer cual de estas proteasas cumple una función en la regulación de la quitina sintetas *in vivo*.

Tabla 1. Efecto de la FIQS sobre quitina sintetasa ensayada en presencia y ausencia de proteasa exógena (renilasa)

Condiciones de activación	Actividad de quitina sintetasa ¹		
	RFM (control)	FIQS	Inactivación (%)
Sin proteasa exógena (Actividad basal) ²	0.63	0.034	94.5
Preactivada	1.43	0.24	83.1
Activada durante el ensayo	3.50	0.14	96.0

Las mezclas de reacción para ensayar quitina sintetasa se incubaron durante 30 min en ausencia o presencia de FIQS (57 µg de proteína) y se midió la radiactividad incorporada en quitina.

¹Expresada como nanomoles de N-acetilglucosamina incorporadas en quitina por min por mg de proteína.

²La actividad basal se refiere a la actividad de quitina sintetasa expresada en ausencia de una proteasa activante exógena.

LITERATURA CITADA

- Bartnicki-García, S. y W.J. Nickerson, 1962. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. J. Bacteriol. 84: 841-858.
- Cabib, E., 1981. Chitin: structure, metabolism, and regulation of biosynthesis. In: Tanner, W. y F.A. Loewus (Eds.). Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol. 13B, Plant Carbohydrates II. Springer, Nueva York.
- Cabib, E. y R. Ulane, 1973. Chitin synthetase activating factor from yeast, a protease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50: 186-191.
- Cabib, E. y R. Ulane, 1974. The activating system of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 249: 3418-3422.
- Campbell, J. McA. y J.F. Peberdy, 1979. Proteases of *Aspergillus nidulans* and the possible role of a neutral component in the activation of chitin synthetase zymogen. FEMS Microbiol. Lett. 6: 65-69.
- Chagolla, A., M. Pedraza y E. López-Romero, 1987. Actividad quitinolítica en extractos libres de células miceliales de *Mucor rouxii*. Rev. Mex. Micol. 3: 283-292.
- Díaz, S. y J. Ruiz-Herrera, 1987. Purification of an acid protease from *Mucor rouxii* that inactivates chitin synthetase. Ant. van Leeuwen. 53: 279-291.
- 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.
- Martínez-Cadena, G., E. López-Romero, I. Acosta, C. González y J. Ruiz-Herrera, 1987. Stabilization of chitin synthetase and purification of chitosomes from several mycelial Mucorales. Ant. van Leeuwen. 53: 171-181.
- McDonald, C.E. y L.L. Chen, 1965. The Lowry modification of the folin reagent for determination of proteinase activity. Anal. Biochem. 10: 175-177.
- Neurath, H., 1984. Evolution of proteolytic enzymes. Science 224: 350-357.
- Pedraza-Reyes, M. y E. López-Romero, 1989. Purification and some properties of two forms of chitinase from mycelial cells of *Mucor rouxii*. J. Gen. Microbiol. 135: 211-218.
- Ruiz-Herrera, J., 1982. Synthesis of chitin microfibrils *in vitro*. In: R.M. Brown. (Ed.). Cellulose and Other Natural Polymer Systems. Plenum Press, Nueva York.
- Ruiz-Herrera, J., 1984. The role of chitosomes in the apical growth of fungi. In: C. Nombela (Ed.). Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis. Elsevier, Amsterdam.

- Wolf, D.H. y C. Ehman, 1978. Isolation of yeast mutants lacking proteinase B activity. FEBS Lett. 92: 121-124.
- Zubenko, G.S., A.P. Mitchell y E.W. Jones, 1979. Septum formation, cell division, and sporulation in mutants of yeast deficient in proteinase B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76: 2395-2399.
- Ruiz-Herrera, J. y S. Bartnicki-García, 1976. Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. J. Gen. Microbiol. 97: 241-249.
- Ruiz-Herrera, J., C.E. Bracker y S. Bartnicki-García, 1984. Sedimentation properties of chitosomes from *Mucor rouxii*. Protoplasma 122: 178-190.
- Schlamowitz, M. y L.U. Peterson, 1959. Studies on the optimum pH for the action of pepsin on "native" and denatured bovine serum albumin and bovine hemoglobin. J. Biol. Chem. 234: 3137-3145.
- Wolf, D.H., 1980. Control of metabolism in yeast and other lower eucaryotes through action of proteinases. Adv. Microbial Physiol. 21: 267-338.