

PROPIEDADES DE LA QUITINA SINTETASA PRESENTE
EN LAS SUBUNIDADES 16S DE Mucor rouxii

Por Ricardo Hernández Delgadillo*
y José Ruiz Herrera**

PROPERTIES OF CHITIN SYNTHETASE PRESENT IN
16S SUBUNITS FROM Mucor rouxii

SUMMARY

Chitin synthetase present in crude wall-membrane fractions from Mucor rouxii was dissociated with digitonin and separated in the form of 16S subunits by centrifugation in lineal sucrose gradients. This enzyme synthesized microfibrils made of highly crystalline α -chitin. Chitin synthetase from 16S subunits was extremely unstable specially once activated by controlled proteolysis. These results plus the effect of inhibitors of neutral proteases on enzyme stability led to the conclusion that 16S subunits contain 3 forms of chitin synthetase in an active equilibrium: pre-"zymogen", "zymogen" and active enzyme.

General characteristics of 16S-chitin synthetase are very similar to those of the chitosomal enzyme. However, it was observed that whereas the properties of the allosteric site of both enzymes were almost identical, the catalytic site lost affinity for the substrate, the cofactor Mg^{2+} , and the competitive inhibitor, polyoxin D.

RESUMEN

Se disoció la quitina sintetasa a partir de fracciones crudas de paredes y membranas de Mucor rouxii por tratamiento con digitonina. La enzima, presente en subunidades 16S, se separó por medio de centrifugación en gradientes de sacarosa, y se procedió a medir algunos de sus parámetros. La enzima fue capaz de sintetizar microfibrillas de α -quitina con un alto grado de cristalinidad. La enzima fue sumamente inestable, especialmente después de ser activada por proteólisis controlada. Los resultados obtenidos en estos análisis conjuntamente con el efecto de inhibidores de proteasas neutras sobre la estabilidad de la enzima, permiten sugerir que las partí-

* Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV del IPN, México, D.F., 07360.

** Departamento de Genética y Biología Molecular del CINVESTAV del IPN e Instituto de Investigación en Biología Experimental, Facultad de Química, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto. 36000.

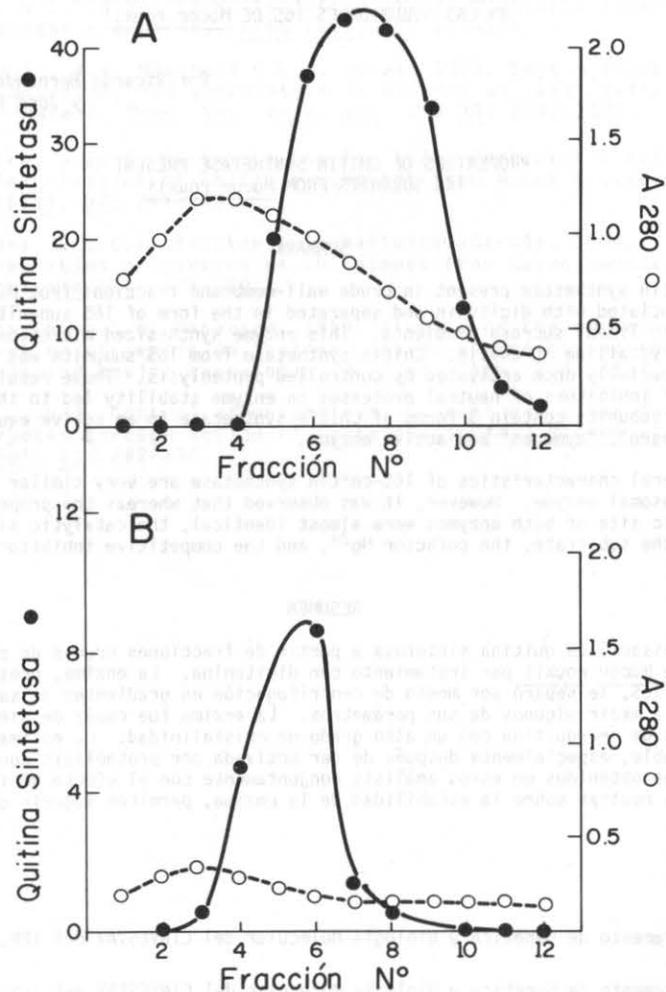


Fig. 1. Sedimentación de las subunidades 16S en gradientes de sacarosa. A. Primer gradiente. B. Segundo gradiente. ● -Actividad total de quitina sintetasa. ○ -Absorbencia a 280 nm.

culas 16S mantienen tres formas de quitina sintetasa en equilibrio dinámico: pre-"zimógeno", "zimógeno" y enzima activa. Las características cinéticas de la enzima en las subunidades 16S fueron similares a las de la enzima quitosomal, aunque se observó que mientras las propiedades del sitio alostérico de ambas enzimas eran prácticamente idénticas, el sitio catalítico de la enzima de las subunidades 16S perdió afinidad por el sustrato, el cofactor Mg^{2+} y el inhibidor competitivo, polioxina D.

INTRODUCCION

La quitina es el polisacárido estructural más ampliamente distribuido entre los hongos (Bartnicki-García, 1968), siendo responsable de la rigidez y la resistencia de la pared de estos organismos; de ahí la importancia que reviste el conocimiento de su mecanismo de síntesis. Glaser y Brown (1957) utilizaron fracciones particuladas de *Neurospora crassa* para sintetizar quitina *in vitro* por primera vez. Estos autores mostraron que la enzima utilizaba como sustrato a la uridina-difosfato-N-acetilglucosamina (UDPGlcNAc); que la acción catalítica requería de un ión divalente, siendo el magnesio el más activo; y que la N-acetilglucosamina (GlcNAc) activaba a la quitina sintetasa. Estas características han sido confirmadas posteriormente para las diferentes preparaciones con actividad de quitina sintetasa estudiadas en un gran número de hongos (revisión por Ruiz-Herrera, 1982). Posteriormente se ha demostrado que la GlcNAc activa en forma alostérica a la quitina sintetasa (McMurrough y Bartnicki-García, 1971; Ruiz-Herrera et al., 1977). Una característica común de las distintas quitina sintetases es el hecho que la cinética de la enzima no es Michaeliana (Ruiz-Herrera, 1982), aunque se ha descrito al menos una excepción, la quitina sintetasa de *Cunninghamella elegans*, la cual a bajas concentraciones de sustrato muestra una cinética normal (Moore y Peberdy, 1975).

En relación con la localización celular de la enzima en hongos filamentosos y algunas levaduras, se ha demostrado que la mayor parte de la enzima se encuentra presente en microvesículas especializadas denominadas quitosomas (Ruiz-Herrera, 1982; Bartnicki-García y Bracker, 1984; Gozalbo et al., 1987; Flores y Schwencke, 1988; Leal-Morales et al., 1988) aunque datos de *Saccharomyces* sugieren que en esta levadura parte de la enzima está asociada con la membrana plasmática (Durán et al., 1975; Cabib, 1987).

A partir de fracciones membranales crudas (Gooday y Rousset-Hall, 1975; Durán y Cabib, 1978; Vermeulen y Wessels, 1983) y quitosomas (Ruiz-Herrera et al., 1980; Hanseler et al., 1983) ha sido posible disociar la quitina sintetasa con digitonina en subunidades con un peso molecular de 500,000 y una velocidad de sedimentación de 16S. Sin embargo no existe un estudio comparativo global de las propiedades de la quitina sintetasa asociada con los quitosomas y la enzima disociada. Estos estudios permitirían establecer las alteraciones que pudiese sufrir la actividad catalítica cuando la enzima se encuentra fuera de la membrana quitosomal. En el presente trabajo hemos estudiado las propiedades generales de la quitina sintetasa de *Mucor rouxi* presente en las subunidades 16S obtenidas por disociación con digitonina, y establecemos una comparación con las características de la enzima quitosomal.

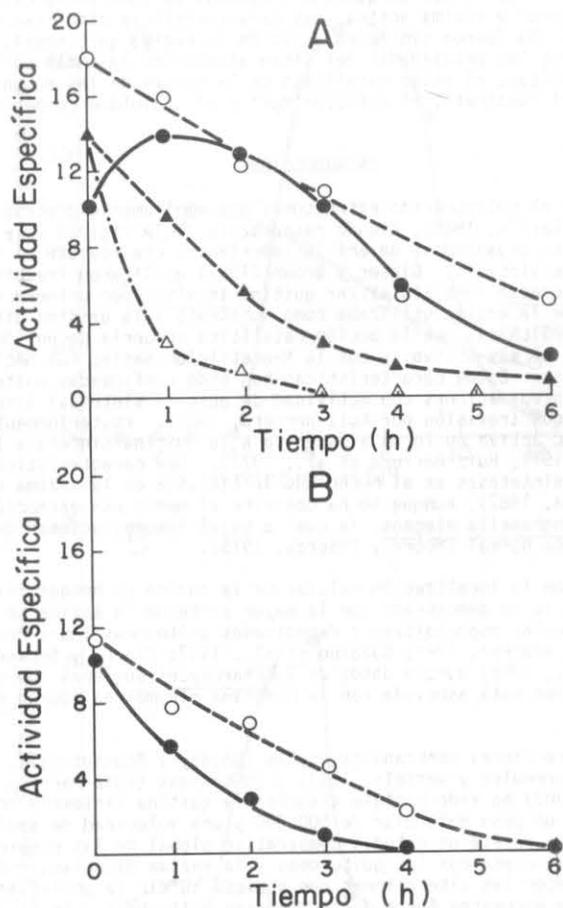


Fig. 2. Inactivación de la quitina sintetasa por incubación de las subunidades 16S a 28°C. A-Enzima no preactivada. ●-Sin adiciones; ○-Con antipaina (10 µg/ml); ▲-Con PMSF (15.3 mM); △-Con antipaina y PMSF. B-Enzima preactivada. ●-Sin adiciones; ○-Con antipaina (10 µg/ml).

MATERIALES Y METODOS

Organismo empleado y métodos de cultivo. En este estudio se empleó *Mucor rouxii* IN80 (ATCC 24905). La cepa se mantuvo en tubos inclinados de medio YPG sólido (Bartnicki-García y Nickerson, 1962). Para obtener esporas en gran cantidad, a partir de tubos inclinados se sembraron botellas de Roux conteniendo medio YPG sólido, las cuales se incubaron a 28°C por 3 a 5 días. Las esporas se cosecharon con agua destilada estéril, se lavaron 3 veces por centrifugación y se resuspendieron en agua destilada estéril. Su número se determinó con un hemocitómetro; y se emplearon $3-4 \times 10^5$ esporas/ml para inocular matraces Erlenmeyer conteniendo 600 ml de medio YPG líquido. Los matraces se incubaron en un baño de agua agitado a 28°C durante 11-12 h.

Separación de la fracción de paredes con membranas. El micelio se cosechó por filtración a través de papel filtro Whatman No. 40 y se lavó 3 veces con 2 l de agua destilada. Posteriormente se resuspendió en regulador FM que contiene KH_2PO_4 -NaOH 50 mM de pH 6.5 y MgCl_2 10 mM. Se mezclaron alícuotas de 20 ml de la suspensión con 20 ml de perlas de vidrio (0.45-0.55 mm de diámetro) y se agitaron por 1 min en un homogenizador de células Braun MSK enfriando con CO_2 líquido. Los extractos así obtenidos se centrifugaron a 1000 g por 10 min a 4°C, y el residuo se lavó 4 veces con regulador FM por centrifugación.

Disociación de la quitina sintetasa. La fracción residual antes obtenida se resuspendió en una solución de digitonina al 0.5% en regulador FM (preparada a partir de una solución que contenía 200 mg/ml de digitonina en dimetil sulfoxido). La mezcla se agitó a 22°C por 60 min y se centrifugó a 9000 g por 10 min. El sobrenadante así obtenido se centrifugó a 62000 g por 60 min a 4°C.

Purificación parcial de la quitina sintetasa por centrifugación en gradientes de sacarosa. La fracción de quitina sintetasa disociada se concentró hasta 0.5 ml a 4°C empleando un ultrafiltro Amicon Modelo 202 equipado con una membrana XM 100A. Se recuperó el material concentrado y la membrana se lavó con regulador FM. Se colocaron fracciones de 3 ml sobre gradientes lineales de sacarosa (5-20%, p/v), conteniendo digitonina al 0.25% y se centrifugaron a 154000 g durante 10 h a 4°C en un rotor Beckman SW 40. Se colectaron fracciones de 1 ml con un fraccionador ISCO Modelo 185, y se midió en forma continua la absorbencia a 280 nm con un registrador ISCO modelo UA5. De cada fracción se tomaron 25 µl para medir la actividad de quitina sintetasa. Las fracciones con mayor actividad enzimática se mezclaron, se diluyeron 1:5 con regulador FM y se procedió a concentrar y centrifugar como se describió anteriormente, excepto que la muestra aplicada a los gradientes fue de 1 ml y estos se centrifugaron por 5 h. Las fracciones con mayor actividad de quitina sintetasa se mezclaron y se usaron como fuente de la enzima disociada.

Determinación de la actividad de quitina sintetasa. Se utilizó el método de filtración descrito por Ruiz-Herrera y Bartnicki-García (1976). La mezcla de reacción contenía UPglcNAc ^{14}C , 0.4 mM, 0.08 µCi; GlcNAc, 16.7 mM; ATP, 0.18 mM; renilasa (una proteasa ácida de *Mucor miehei*), 1 mg/ml; una cantidad variable de digitonina; y enzima, en un volumen final de 150 µl de regulador FM. Las muestras se incubaron por 30 o 60 min a 22°C. La reacción se detuvo añadiendo 0.1 ml de ácido acético glacial y la mezcla se aplicó a filtros de fibra de vidrio Reeve Angel 934 AH de 2.4 cm de diámetro que se lavaron con 50 ml de una mezcla de ácido acético 1M: etanol al

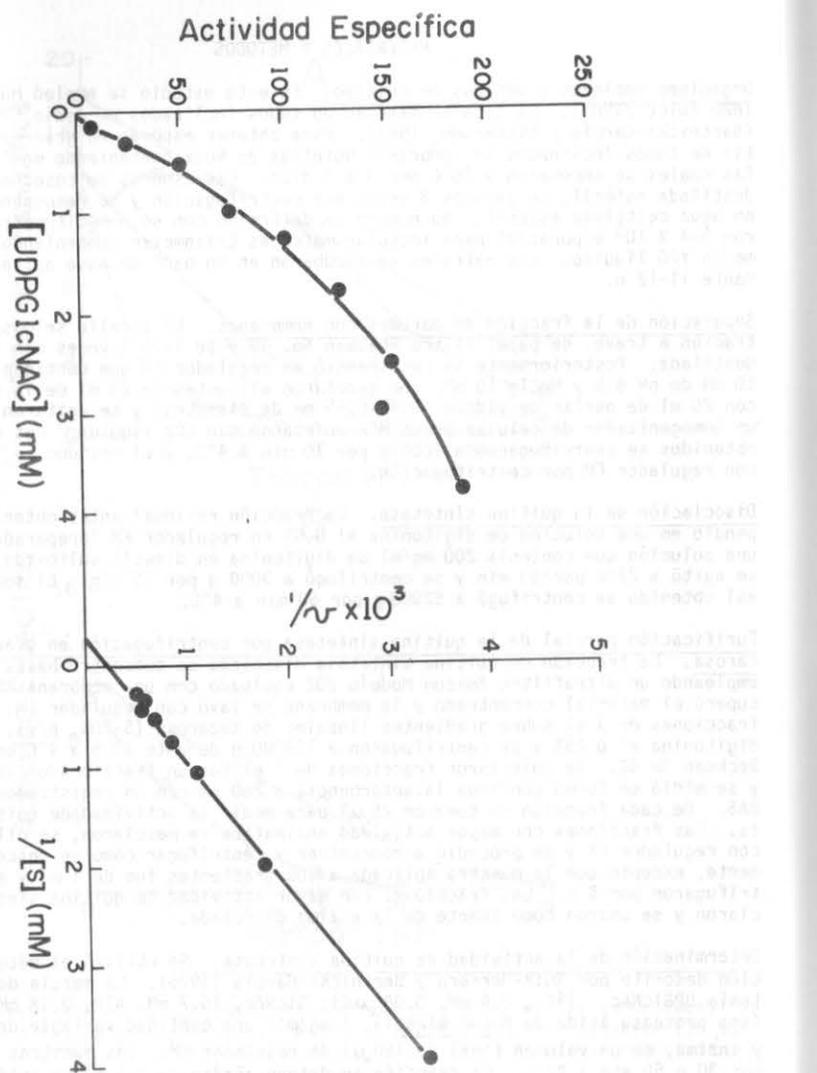


Fig. 3. Efecto de la concentración de UDPGlcNAC sobre la actividad de quitina sintetasa. Izquierda. Velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato. Derecha. Representación gráfica de los datos de A, por el método de Lineweaver y Burk.

95% (7:3, v:v) y se secaron a 100°C. Los filtros se colocaron en frascos de centelleo conteniendo 4 ml de líquido de centelleo (100 mg de dimetil POPOP y 2 g de PPO en 1 l de tolueno) y se midió la radioactividad. La actividad de la enzima se expresó como nanomoles de GlcNAC incorporados en quitina (material insoluble) en 1 min; la actividad específica se refirió a 1 mg de proteína.

Identificación del producto de la reacción enzimática. Esta se logró por difracción de rayos X empleando un difractómetro Norelco Phillips, al que se adaptó una cámara de polvos Debye-Scherrer de 114.6 mm usando radiación $\text{CuK}\alpha$.

Determinación de proteínas. Se usó el método de Lowry *et al.* (1951) para proteínas insolubles, con albúmina bovina como patrón.

RESULTADOS

Extracción y separación de la quitina sintetasa en gradientes de sacarosa. La enzima disociada con digitonina sedimentó en gradientes de sacarosa en forma de un solo pico de actividad, (Fig. 1A), aunque como era de esperarse, el pico de la segunda centrifugación fue más definido por el menor volumen de muestra empleado (Fig. 1B). Las características de sedimentación de la enzima en los gradientes de sacarosa coincidieron con las de las subunidades 16S obtenidas a partir de quitosomas de la fase de levadura del hongo (Ruiz Herrera *et al.*, 1980). La recuperación de la actividad fue baja (Tabla 1), ya que la enzima disociada es muy inestable (Ruiz-Herrera *et al.*, 1980; ver mas adelante).

Estabilidad de la quitina sintetasa. Para estos experimentos la enzima se pre-activó o no con renilasa (1 mg/ml) por 45 min; en el primer caso la activación se detuvo por adición de 10 $\mu\text{g/ml}$ de pepstatina A. Las muestras preactivadas o no, se incubaron en la oscuridad a 28°C, y a intervalos de tiempo se tomaron alícuotas que se incubaron por 30 min en las condiciones normales para determinar la actividad de quitina sintetasa, excepto que en el caso de la enzima preactivada se omitió la renilasa en el ensayo. Las muestras de quitina sintetasa, tanto activada como no activada por proteólisis, fueron sumamente inestables, con vidas medias cercanas a 150 y 180 min respectivamente (Fig. 2), aunque cabe hacer notar que durante la primera hora de incubación, el nivel de enzima no activada subió mas de un 30% de su valor inicial (Fig. 2A).

Presuponiendo que la pérdida en la actividad de la quitina sintetasa fuese debida a una acción proteolítica, se probó el efecto de dos inhibidores de proteasas neutras, la antipaína y el PMSF. Los resultados obtenidos (Fig. 2) fueron inesperados. Por un lado, la antipaína efectivamente disminuyó la velocidad de inactivación de la quitina sintetasa preactivada, cuya vida media se incrementó de 70 a 140 min en presencia de la droga, y de la enzima sin activar cuya vida media se incrementó a 4 h; pero sorpresivamente la adición de PMSF aceleró la inactivación de la quitina sintetasa reduciendo su vida media a cerca de 90 min, en tanto que la mezcla de PMSF y antipaína aceleró aún mas la destrucción de la enzima no activada cuya vida media se redujo a cerca de 30 min (Fig. 2A). Resultados similares en los que los inhibidores de proteasas neutras aceleraron la inactivación de la quitina sintetasa "zimogénica" fueron obtenidos con la enzima de *Neurospora crassa* (Arroyo-Begovich y Ruiz-Herrera, 1979).

Identificación del producto de la reacción enzimática. Se incubó la enzima disociada con UDPGlcNAC 1.95 mM, GlcNAC 32 mM y 0.4 mg/ml de renilasa en un volumen final

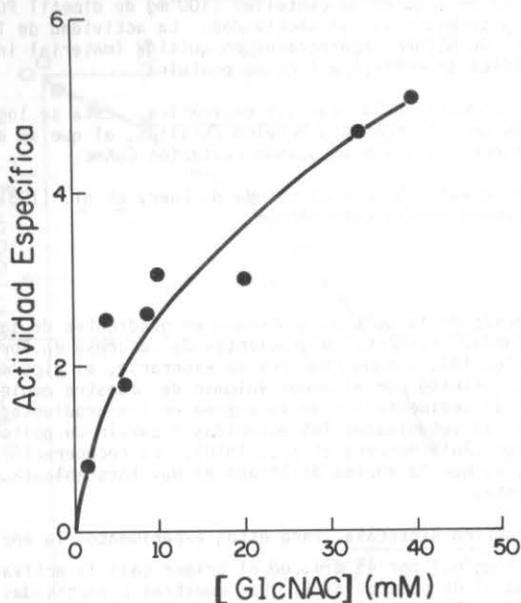


Fig. 4. Efecto de la concentración de GlcNAC sobre la actividad de quitina sintetasa.

de 12.7 ml de regulador FM a 28°C en la obscuridad por 140 min. Al cabo de este tiempo se centrifugó la mezcla de reacción a 5000 g por 10 min y se separó el sedimento. Al sobrenadante se añadieron 8 mg de UDPGlcNAC y se continuó la incubación por 4 h más en las mismas condiciones, al cabo de las cuales la mezcla se centrifugó nuevamente. Ambos precipitados se lavaron separadamente por centrifugación 4 veces cada vez con 10 ml de agua destilada, NaOH 1M, agua destilada, HCl 1M y finalmente, 6 veces con agua destilada. Se liofilizaron y se determinó su espectro de difracción de rayos X. Ambas muestras demostraron ser α -quitina con un alto grado de cristalinidad.

Requerimiento de activación proteolítica. La actividad de la enzima disociada no sometida a proteólisis controlada, fue muy baja. La adición de renilasa (0.8-1 mg/ml) activó la enzima entre 10 y 15 veces.

Cinética de la reacción. En las condiciones de ensayo empleadas, la actividad fue linealmente dependiente del tiempo y la concentración de enzima en el rango de 90 min y 0-25 μ g de proteína, respectivamente.

Efecto de la concentración de sustrato sobre la reacción catalítica. Se incubaron alícuotas de la enzima disociada conteniendo 9.7 μ g de proteína con concentraciones variables de UDPGlcNAC, manteniendo constantes los demás reactantes. Al cabo de 60 min de incubación se detuvo la reacción y se midió la quitina sintetizada como se describió en Materiales y Métodos. La gráfica que relaciona la velocidad de reacción en función de la concentración de sustrato mostró una cinética normal (Fig. 3A). La representación gráfica de los resultados por el método de Lineweaver y Burk fue lineal, con valores calculados para la K_m de 3.3 mM y para la V_{max} de 500 nmoles/min (Fig. 3B). A partir de estos resultados se expresaron los resultados por el método de Hill que relaciona el log $v/V-v$ con el log $[S]$, donde v es la velocidad de reacción a una concentración de sustrato S , y V es la velocidad máxima (Segel, 1976). El valor calculado para el coeficiente de Hill (n_H) fue de 0.94.

Efecto de la concentración de GlcNAC. Alícuotas de la fracción enzimática conteniendo 1.2 μ g de proteína se incubaron en la obscuridad con concentraciones variables de GlcNAC, manteniendo constantes las concentraciones del resto de los reactantes. Al cabo de 60 min de incubación se detuvo la reacción enzimática y se midió la quitina sintetizada. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4. Se observa que la GlcNAC estimuló fuertemente la actividad; de hecho la actividad en ausencia del azúcar fue mínima. La concentración necesaria para obtener la mitad de la velocidad máxima (K_a) se calculó por el método de Lineweaver y Burk, dando un valor de 13.57 mM.

Efecto de la concentración de magnesio. Como se señaló anteriormente, prácticamente todas las quitinas sintetizadas requieren de un catión divalente para su actividad, siendo el Mg^{2+} generalmente el más eficiente (Ruiz-Herrera, 1982). Para determinar el efecto de este ión sobre la actividad de la quitina sintetasa disociada se incubaron fracciones de la enzima conteniendo 9 μ g de proteína en presencia de diferentes concentraciones de $MgCl_2$, manteniendo constantes el resto de los reactantes. La quitina sintetizada se midió al cabo de 60 min. En ausencia de $MgCl_2$ no se obtuvo actividad alguna (Fig. 5). La actividad máxima se obtuvo con concentraciones de $MgCl_2$ entre 30 y 50 mM, siendo 7.65 mM la concentración necesaria para obtener la mitad de la velocidad máxima (K_a), según datos calculados por el método de Lineweaver y Burk.

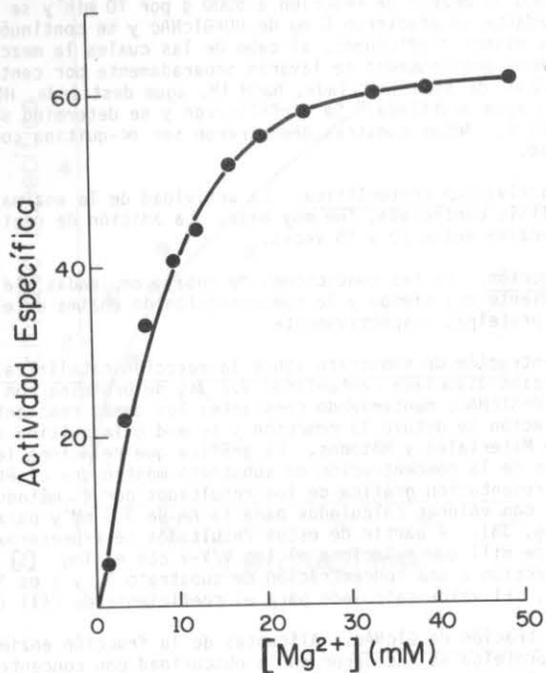


Fig. 5. Efecto de la concentración de Mg²⁺ sobre la actividad de quitina sintetasa.

Efecto del UDP y la polioxina. El UDP, el cual es un producto de la reacción enzimática, es un inhibidor de la quitina sintetasa de varios hongos (Ruiz-Herrera, 1982), incluyendo *Mucor rouxii* (Ruiz-Herrera et al., 1977). Para determinar su efecto sobre la enzima disociada, se incubaron por 60 min fracciones de enzima conteniendo 8.3 μg de proteína en mezclas de incubación normales conteniendo UDPGlc-NAc 0.2 ó 0.4 mM, y concentraciones variables de UDP. Se observó que el UDP inhibió la enzima, pero con una cinética anormal. Al analizarse los datos por el método de Dixon se observa que la cinética es competitiva solo a concentraciones muy bajas de inhibidor, con una K_i de 0.25 mM (Fig. 6).

La polioxina D es miembro del grupo de inhibidores competitivos de la quitina sintetasa conocidos como nucleótido-péptidos (Endo et al., 1970). Se probó su efecto sobre la quitina sintetasa disociada incubando fracciones de la enzima (8 μg de proteína) con concentraciones variables del inhibidor a dos concentraciones de sustrato, 0.2 y 0.4 mM. Al cabo de 60 min de incubación se midió la quitina sintetizada. Los resultados obtenidos (Fig. 7) muestran que la polioxina D es un inhibidor competitivo. La K_i calculada fue de 3.4 μM .

DISCUSION

Al igual que se describió para la quitina sintetasa disociada con digitonina a partir de quitosomas de *Mucor rouxii* (Ruiz-Herrera et al., 1980), la enzima disociada a partir de fracciones crudas de pared y membranas, fue activada por proteólisis controlada. Estos resultados están de acuerdo con la observación que la enzima disociada a partir de fracciones membranales crudas de *Saccharomyces* (Duran y Cabib, 1978) y *Schizophyllum commune* (Vermeulen y Wessels, 1983), o quitosomas de *Agaricus bisporus* (Hanseler et al., 1983), tiene una pobre actividad catalítica, a menos que sea activada por proteólisis controlada.

La enzima disociada de *M. rouxii* demostró ser sumamente inestable, especialmente una vez activada por proteólisis. Una observación importante fue que los niveles de la enzima activable por proteólisis ("zimogénica") se incrementaron durante la primera hora de incubación a 28°C, lo que indica que existía inicialmente una fracción de la quitina sintetasa insensible a la activación proteolítica. Este resultado combinado con el efecto mostrado por los inhibidores de proteasas, sugieren que la enzima se encuentra en tres estadios que mantienen un equilibrio dinámico: activa, "zimogénica" y pre-"zimogénica". De acuerdo con esta hipótesis la enzima activa sería inactivada por un sistema parcialmente sensible a la antipaína, en tanto que la fracción pre-"zimogénica" sería transformada en "zimógeno" por un sistema inhibible por PMSF y en forma sinérgica por PMSF y antipaína. De estos análisis puede además concluirse que la enzima y los mecanismos de activación e inactivación se hallan asociados en las mismas partículas o al menos en partículas muy semejantes. Sin embargo, la posibilidad de que los elementos activadores e inactivadores sean proteasas inespecíficas adsorbidas durante el proceso de rompimiento del hongo, no puede ser eliminada. Cabe hacer notar que el concepto de zimógeno no debe tomarse en su sentido literal, ya que el mecanismo de activación proteolítica, y su papel fisiológico, aún no han sido esclarecidos (para una revisión, ver Ruiz-Herrera, 1982 y Martínez-Cadena y Ruiz-Herrera, 1987). Un mecanismo en cascada ha sido sugerido, mediante evidencias experimentales, para la activación de la quitina sintetasa de *Phycomyces* por la luz y la tripsina (Reyna y Ruiz-Herrera, 1987).

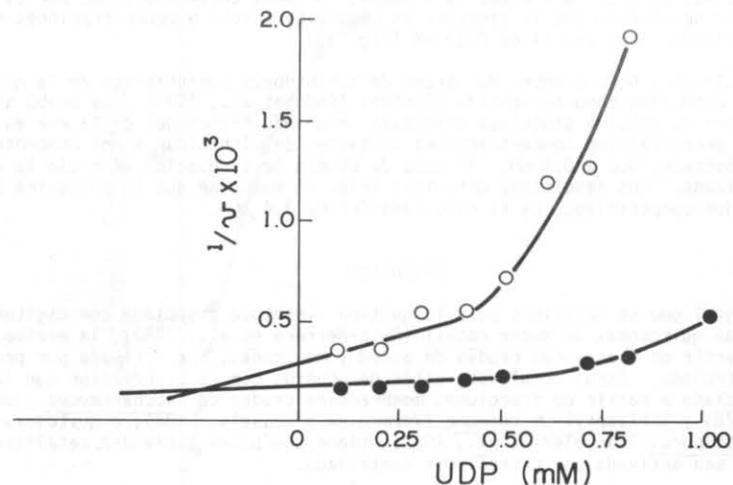


Fig. 6. Cinética de inhibición de la quitina sintetasa por el UDP. Los resultados aparecen expresados por el método de Dixon. La velocidad (v) corresponde a la actividad específica. ● -UDPGlcNAc 0.4 mM; ○ -UDPGlcNAc 0.2 mM.

En la Tabla 2 se muestran las características cinéticas generales de la quitina sintetasa presente en las subunidades 16S, comparada con la enzima quitosomal o particulada, obtenida de levaduras y micelio de *Mucor rouxii*. Algunas consideraciones pueden hacerse respecto a estos datos. En primer lugar se debe mencionar el tipo de cinética de la reacción catalítica, la cual en presencia de altas concentraciones de GlcNAc es sigmoideal a bajas concentraciones de sustrato, y parabólica si se consideran solamente los datos obtenidos a altas concentraciones de sustrato (Ruiz-Herrera et al., 1977). La enzima disociada con digitonina mostró una cinética de tipo Michaelis-Menten a altas concentraciones de sustrato, en presencia de GlcNAc.

El requerimiento de GlcNAc por parte de la enzima disociada con digitonina fue casi absoluto. Estos resultados coinciden con los datos obtenidos con quitosomas aislados de levaduras de *M. rouxii*, pero no con aquellos aislados del micelio, los cuales se estimulan a un nivel significativamente menor (Martínez-Cadena et al., 1987). Los valores de K_a para GlcNAc de la enzima presente en fracciones membranales crudas y para la enzima disociada fueron similares, y mayores que los de la enzima quitosomal (López-Romero, 1975), aunque cabe hacer notar que la enzima disociada no se saturó, incluso con concentraciones de GlcNAc mayores de 40 mM. La GlcNAc en altas concentraciones corrige la cinética de la enzima (datos no mostrados), al igual que ocurre con la quitina sintetasa quitosomal (Ruiz-Herrera et al., 1977). En el caso de la quitina sintetasa de *Coprinus cinereus* (Rousset-Hall y Gooday, 1975) y de *Agaricus bisporus* (Hanseler et al., 1983), la GlcNAc incluso a altas concentraciones fue incapaz de corregir la cinética sigmoideal de la enzima.

El valor del coeficiente de Hill (n_H) de la enzima fue muy parecido al de la enzima quitosomal (Ruiz-Herrera, 1982). El valor de n_H para la enzima de *C. cinereus* fue de 1.7 y 4.0 a concentraciones de UDPGlcNAc mayores y menores de 0.1 mM respectivamente (Rousset-Hall y Gooday, 1975). En forma similar el valor de n_H para la enzima de *A. bisporus* fue de 1.9 en ausencia de GlcNAc y 1.3 en concentraciones saturantes de azúcar. Considerando que tanto la GlcNAc como el propio sustrato son efectores alostéricos (McMurrrough y Bartnicki-García, 1971; Rousset-Hall y Gooday, 1975; Ruiz-Herrera et al., 1977), es posible suponer que el mayor número de sitios de unión del sustrato son alostéricos y no catalíticos. La enzima mostró un requerimiento absoluto de Mg^{2+} ; en tanto que la enzima quitosomal mostraba una actividad basal en ausencia del ión (Ruiz-Herrera et al., 1977). Este resultado puede ser atribuido a que la enzima en el segundo caso estuviese contaminada con trazas de Mg^{2+} , ya que si las fracciones enzimáticas se dializan contra EDTA, muestran un requerimiento absoluto de Mg^{2+} (Ruiz-Herrera, 1982).

Al igual que la enzima quitosomal (Ruiz-Herrera et al., 1977), la enzima disociada fue inhibida por el UDP con una cinética mixta compleja, y por la polioxina con una cinética competitiva. La cinética compleja de inhibición por el UDP puede ser debida a que se una preferentemente al sitio alostérico. Finalmente es importante señalar que aparentemente las propiedades del sitio alostérico de la enzima K_a GlcNAc, n_H , K_i UDP, no fueron afectadas por la disociación de la quitina sintetasa por la digitonina; en tanto que las propiedades del sitio catalítico sí fueron afectadas durante la disociación, disminuyendo la afinidad por el sustrato, cofactores e inhibidores: K_m , K_a Mg^{2+} , y K_i polioxina. Estos resultados sugieren que la organización de la enzima en la membrana quitosomal modifica significativamente su estructura. En este sentido es importante señalar que se ha demostrado que el ambiente hidrofóbico que aportan los lípidos, parece jugar un papel importante en la reacción catalítica.

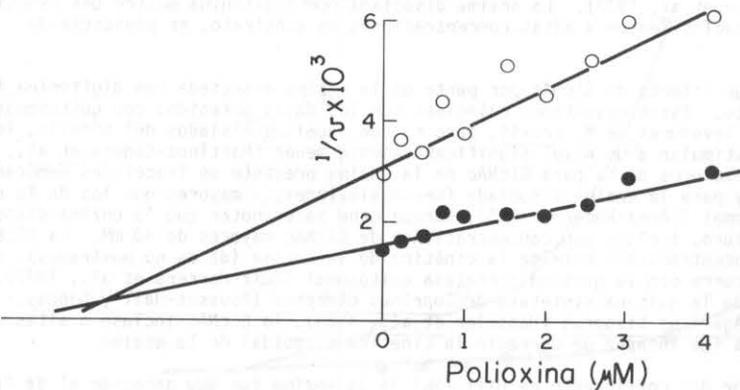


Fig. 7. Cinética de inhibición de la quitina sintetasa por la polioxina D. Los resultados aparecen expresados por el método de Dixon. La velocidad (v) corresponde a la actividad específica. ● -UDPGlcNAc 0.4 mM; O-UDPGlcNAc 0.2 mM.

ca (López-Romero, 1975; Vermeulen y Wessels, 1983).

ABREVIATURAS USADAS

GlcNAc, N-acetilglucosamina; UDPGlcNAc, uridina-difosfato N-acetilglucosamina; PMSF, fenil-metil-sulfonil-fluoruro; EDTA, etilen-diamino tetraacetato de sodio; POPOP, 1,4-bis 2-(4-metil-5-fenil-oxazolil)-benceno; PPO, 2,5-difeniloxazol.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con apoyo parcial de DIGICySA de la Subsecretaría de Educación Superior e Investigación Científica de la SEP, y del CONACyT. Los análisis de quitina por difracción de rayos X fueron realizados por la Sra. Eleanor Lippman y el Dr. Salomón Bartnicki-García de la Universidad de California, Riverside, E.U.A. José Ruiz Herrera es Investigador Nacional.

Tabla 1. Disociación de la quitina sintetasa con digitonina y purificación de las subunidades 16S

FRACCIÓN	PROTEÍNA TOTAL	ACTIVIDAD TOTAL	ACTIVIDAD ESPECÍFICA	RECUPERACIÓN (%)
Sobrenadante 62000 g	27.23	1109.6	40.7	100
Ier. gradiente	4.40	142.4	32.3	12.8
2° gradiente	2.44	74.1	30.4	6.7

Tabla 2. Propiedades comparativas de la quitina sintetasa de las subunidades 16S y quitosomal

PARÁMETRO	16S	QUITOSOMAS	REFERENCIA*
Estado	"Zimogénico"	"Zimogénico"	1
Cinética**	Sigmoidal o normal	Sigmoidal o normal	1
Km	3.3 mM	0.5 mM	1
η_h	0.94	1.0	1
Ka Mg ²⁺	7.7 mM	2.5 mM	1
Mg ²⁺ PARA V max	30 mM	5 mM	1
Ka GlcNAc	13.6 mM	12.5 mM	2
[GlcNAc] para V max	40 mM	20 mM	3
Cinética polioxina	Competitiva	Competitiva	1
Ki Polioxina	3.4 μ M	0.65 μ M	1
Cinética UDP	Compleja	Compleja	1
Ki UDP	0.25 mM	0.4 mM	1

* 1. Ruiz-Herrera et al. (1977); 2. McMurrough y Bartnicki-García (1971); 3. López-Romero (1975).

** Dependiendo de la concentración de UDPGlcNAc; ver texto.

LITERATURA CITADA

- Arroyo-Begovich, A. y J. Ruiz-Herrera, 1979. Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 113: 339-345.
- Bartnicki-Garcia, S., 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.
- Bartnicki-Garcia, S. y C.E. Bracker, 1984. Unique properties of chitosomes. In: C. Nombela (ed). *Microbial cell wall synthesis and autolysis*. Elsevier, Amsterdam.
- Bartnicki-García, S. y W.J. Nickerson, 1982. Nutrition, growth and morphogenesis of *Mucor rouxii*. *J. Bacteriol.* 84: 841-858.
- Cabib, E. 1987. The synthesis and degradation of chitin. *Adv. Enzymol.* 59: 59-101.
- Duran, A. y E. Cabib, 1978. Solubilization and partial purification of yeast chitin synthetase. Confirmation of the zymogenic nature of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 253: 4419-4425.
- Duran, A., B. Bowers y E. Cabib, 1975. Chitin synthetase zymogen is attached to the yeast plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 3952-3955.
- Endo, A., K. Kakiki y T. Misato, 1970. Mechanism of action of the anti-fungal agent polyoxin D. *J. Bacteriol.* 104: 189-196.
- Flores, A. y J. Schwencke, 1988. Chitin synthetase activity is bound to chitosomes and to the plasma membrane in protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 946: 328-336.
- Glaser, L. y D.H. Brown, 1957. The synthesis of chitin in cell-free extracts of *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 228: 729-742.
- Gooday, G.W. y A.D. Rousset-Hall, 1975. Properties of chitin synthetase from *Coprinus*. *J. Gen. Microbiol.* 89: 137-145.
- Gozalbo, D., F. Dubon, J. Schwencke y R. Sentandreu, 1987. Characterization of chitosomes in *Candida albicans* protoplasts. *Exp. Mycol.* 11: 331-338.
- Hanseler, E., L.E. Nyhien, y D.M. Rast, 1983. Dissociation and reconstitution of chitosomes. *Biochim. Biophys. Acta* 745: 121-133.
- Leal-Morales, C.A., C.E. Bracker y S. Bartnicki-Garcia, 1988. Localization of chitin synthetase in cell-free homogenates of *Saccharomyces cerevisiae*: chitosomes and plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8516-8520.
- 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.
- Lopez-Romero, E., 1975. Estudio sobre la biosíntesis de quitina en *Aspergillus flavus* y *Mucor rouxii*. Tesis Doctoral. Instituto Politécnico Nacional, México.
- Martínez-Cadena, G. y J. Ruiz-Herrera, 1987. Activation of chitin synthetase from *Phycomyces blakesleeianus* by calcium and calmodulin. *Arch. Microbiol.* 148: 280-285.
- 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. v. Leeuw.* 53: 171-182.
- McMurrugh, I. y S. Bartnicki-Garcia, 1971. Properties of particulate chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.* 246: 4008-4016.
- Moore, P.M. y J.F. Peberdy, 1975. Biosynthesis of chitin by particulate fractions from *Cunninghamella elegans*. *Microbios* 12: 29-39.
- Reyna, G. y J. Ruiz-Herrera, 1987. Fotoactivación in vitro de la quitina sintetasa de los esporangioforos de *Phycomyces blakesleeianus*. *Rev. Mex. Mic.* 3: 249-263.
- Rousset-Hall, A.D. y G.W. Gooday, 1975. A kinetic study of a solubilized chitin synthetase preparation from *Coprinus cinereus*. *J. Gen. Microbiol.* 89: 140-154.
- Ruiz-Herrera, J. 1982. Synthesis of chitin microfibrils in vitro. In: R.M. Brown Jr. (ed.) *Cellulose and other natural polymer systems*. Plenum Press, Nueva York.
- Ruiz-Herrera, J. y S. Bartnicki-Garcia, 1976. Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. *J. Gen. Microbiol.* 97: 241-249.
- Ruiz-Herrera, J., E. Lopez-Romero y S. Bartnicki-Garcia, 1977. Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. *J. Biol. Chem.* 252: 3338-3343.
- Ruiz-Herrera, J., S. Bartnicki-Garcia y C.E. Bracker, 1980. Dissociation of chitosomes by digitonin into 16S subunits with chitin synthetase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 629: 201-216.
- Segel, I.H., 1976. *Biochemical calculations*. 2nd. Edition. John Wiley, Nueva York.
- Vermeulen, C.A. y J.G.H. Wessels, 1983. Evidence for a phospholipid requirement of chitin synthase in *Schizophyllum commune*. *Curr. Microbiol.* 8: 67-71.