

CARACTERIZACIÓN DE ENZIMAS ENDOCELULARES Y EXOCELULARES DE SÍNTESIS DE GLUCOSAMINA Y N-ACETILGLUCOSAMINA EN *PROTEUS MIRABILIS*

por

C. VICENTE, PILAR HERRERO y L. F. MARTÍN

INTRODUCCIÓN

El glucopéptido de las paredes celulares bacterianas está formado por tres tipos de cadenas diferentes:

A) Cadenas de glúcidos, en las que alternan N-acetil glucosamina y ácido N-acetil muránico en uniones β -1,4.

B) Cadenas peptídicas del tipo L-alanil-D-glutamil-L-lisil-D-alanina, pudiendo a veces ser sustituido el ácido D-glutámico por diaminopimélico.

C) Puentes de unión, de distintos tipos, específicos para cada especie, aunque sujetos a una amplia variación. Pueden ser uniones directas al péptido, por medio de aminoácidos, por uniones cabeza-cola o por grupo α -carboxilo del ácido glutámico con una cadena vecina. Para las bacterias gram negativas, el glucopéptido puede degradarse por acción de una N-acetil glucosaminidasa (WHITESIDE y CORPE, 1969), que no es activa para bacterias gram positivas (MARTÍN y KEMPER, 1970).

Preparaciones de lípidos A, banda covalente en los lipopolisacáridos de paredes celulares de bacterias gram negativas, contiene glucosamina, ácidos grasos, fosfatos y, frecuentemente, pequeñas cantidades de etanolamida. Por hidrólisis ácida ha podido comprobarse que gran parte de los residuos de glucosamina están acetilados. En algunos microorganismos está reemplazada la glucosamina por galactosamina (COSTERTON et al., 1974).

La síntesis de glucosamina se lleva a cabo por una glucosamina sintetasa que utiliza glutamina como donadora de grupos $-\text{NH}_2$ (LOWERS y ROGERS, 1956). La glutamina es, a su vez, sintetizada, por una glutamina sintetasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Proteus mirabilis, NCIB 5887, mantenido en medios sólidos recomendados por MAGAÑA y RUIZ (1967) se sembraron en medios líquidos recomendados por los mismos autores y suplementados con glucosa, sulfato amónico o glutamina en los casos y a las concentraciones que se indiquen. Las bacterias eran crecidas sobre estos medios líquidos a 37° C en una agitación de 120 oscilaciones por minuto. Las células, cultivadas según las condiciones requeridas en cada caso, eran recogidas por centrifugación a 16.600 x g durante 10 minutos a 4° C, lavándose posteriormente con tampón fosfato de 75 mM de pH 7,7. La ruptura de las células se llevaba a cabo por sonicación en un oscilador MSE durante 1 minuto con protección de hielo, añadiendo al tampón de extracción 2-mercapto etanol 0,14 M. Este extracto crudo era centrifugado a 28.000 x g durante 20 minutos a 4° C, utilizándose el sobrenadante como extracto libre de células.

Las actividades hexosamina sintetasa y N-acetil hexosamina sintetasa se estimaban mediante el método de DISCHE y BORENFREUND (1950). Las proteínas se valoraban por el método de LOWRY et al. (1951). La separación de los diferentes enzimas para síntesis de aminoazúcares se llevó a cabo por filtración a través de columnas de Sephadex G-200, de 21 cm de altura por 2 cm de diámetro, equilibradas con tampón fosfato 1 mM de pH 7,7, eluyendo las proteínas al aumentar la molaridad del tampón.

RESULTADOS

Para la detección de enzimas que conducen a síntesis de hexosaminas y N-acetil hexosaminas se sembraron bacterias en los medios descritos, suplementados con glucosa 50 mM y sulfato amónico 40 mM. Para un período de diez horas, la actividad enzimática en extractos acelulares para síntesis de N-acetil hexosaminas aumenta paralelamente al

crecimiento de la población bacteriana, estabilizándose a partir de las 8 horas de cultivo. Por el contrario, la actividad enzimática para síntesis de hexosaminas muestra un desarrollo cuatro veces menor, estabilizándose a partir de las cuatro primeras horas de cultivo (figura 1).

Así mismo se han determinado idénticas actividades enzimáticas

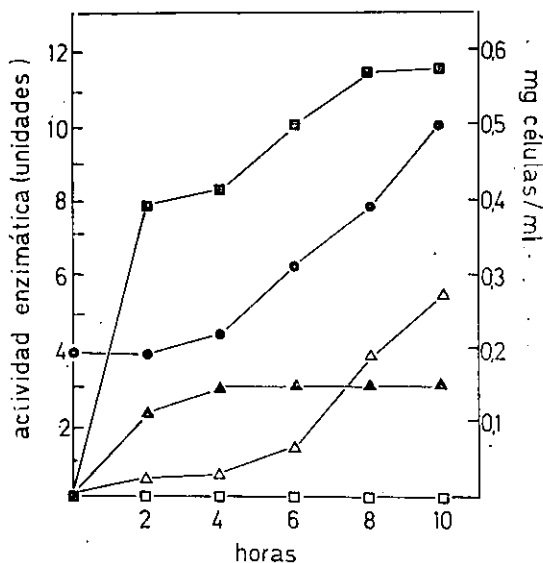


Figura 1.—Crecimiento y actividades de síntesis para hexosaminas y N-acetil hexosaminas en cultivos de *Protus mirabilis* sobre glucosa y sulfato amónico. (●) crecimiento; (■) N-acetil hexosamina sintetasa en células; (▲) hexosamina sintetasa en células; (□) N-acetil hexosamina sintetasa en medio; (△) hexosamina sintetasa en medio.

en los medios en que las células han sido cultivadas una vez eliminadas éstas por centrifugación. En el período de experimentación de diez horas no aparece ninguna actividad para síntesis de N-acetil hexosaminas excretada al medio. Por el contrario, la actividad para síntesis de hexosaminas aumenta progresivamente en el medio, alcanzando para las diez horas de cultivo un valor doble que el encontrado en los extractos acelulares (figura 1).

Cuando el sulfato amónico es sustituido por glutamina 40 mM, las

actividades enzimáticas analizadas muestran una conducta de aparición radicalmente distinta a la descrita en el caso anterior. Durante las diez horas de cultivo, la población bacteriana no experimenta ningún crecimiento y en los extractos acelulares no se detecta, para ninguno de

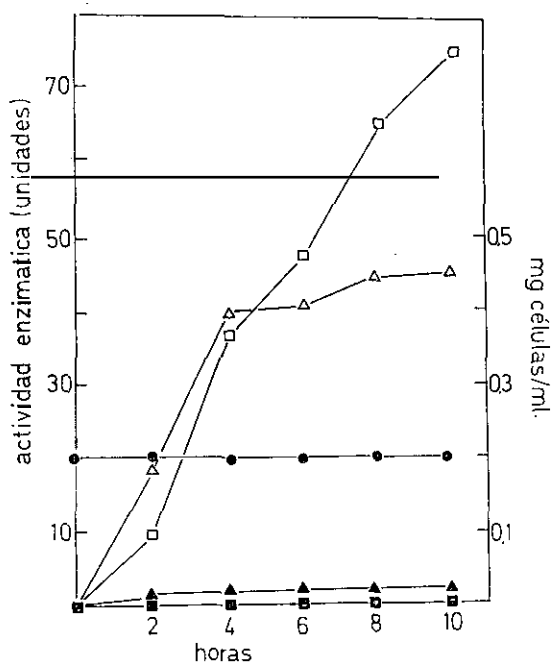


Figura 2.—Crecimiento y actividades de síntesis para hexosaminas y N-acetil hexosaminas en cultivos de *Proteus mirabilis* sobre glucosa y glutamina. (●) crecimiento; (■) N-acetil hexosamina sintetasa en células; (▲) hexosamina sintetasa en células; (□) N-acetil hexosamina sintetasa en medio; (△) hexosamina sintetasa en medio.

los tiempos, actividad apreciable de síntesis de N-acetil hexosaminas. Sin embargo, la actividad enzimática para síntesis de hexosaminas existe en este caso, estabilizándose a partir de las cuatro primeras horas de cultivo, aunque el máximo nivel obtenido es aproximadamente tres veces inferior al encontrado para bacterias que crecen sobre sulfato amónico (figura 2).

Al ser medidas las actividades enzimáticas en los medios de cultivo, se encuentra un incremento exponencial para el enzima de síntesis de N-acetil hexosaminas, constante para las diez horas de experimentación. El enzima para síntesis de hexosaminas aumenta en las cuatro primeras horas, estabilizándose a partir de este tiempo (figura 2).

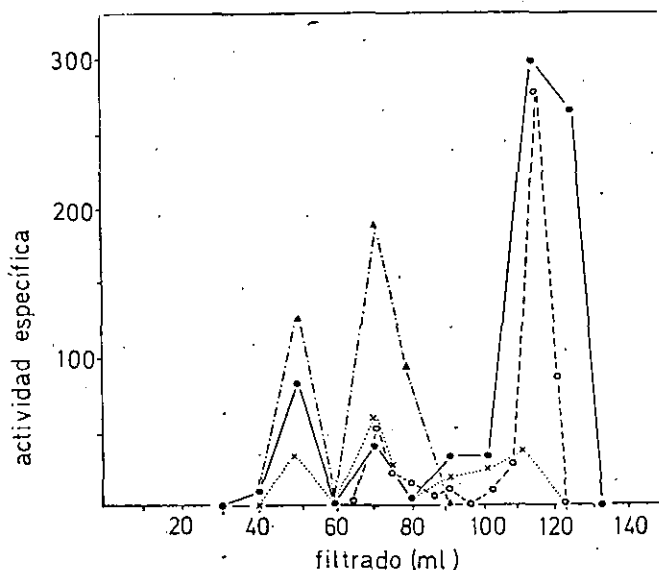


Figura 3.—Filtración a través de columnas de Sephadex G-200 de extractos libres de células y medios de cultivo, previamente dializados, detectando en ellos actividades N-acetil hexosamina sintetasa. (●) extracto libre de células crecidas sobre glucosa y sulfato amónico; (○) medio de cultivo correspondiente a las células citadas; (×) extracto libre de células crecidas sobre galactosa y sulfato amónico; (▲) extracto libre de células crecidas sobre manosa y sulfato amónico.

Al existir enzimas endocelulares y exocelulares que conducen a la síntesis de aminoazúcares habría que averiguar si se trata de una única proteína enzimática o de dos proteínas distintas. Una aproximación a tal caracterización sería investigar el comportamiento en filtración a través de Sephadex G-200 de ambos sistemas enzimáticos. Para ello, se cultivan bacterias en medios suplementados con glucosa 50 mM y sulfato amónico 40 mM durante ocho horas, período en el cual la apari-

ción de enzimas que conducen a la síntesis de N-acetil hexosaminas es máxima. El medio, después de desecado a vacío, fue disuelto en 10 ml de tampón fosfato 1 mM, pH 7.7. Esta disolución, así como el extracto libre de células correspondiente, fueron dializados durante 5 horas a 4° C frente a tampón fosfato de igual molaridad y pH, cambiando dos veces el baño de agitación. Ambas muestras fueron entonces pasadas por una columna de Sephadex G-200, de 21 cm de altura por 2 cm de diámetro, equilibrada con el mismo tampón. Las fracciones, de 10 ml de volumen, son eluidas utilizando tampones fosfato de molaridades crecientes desde 1 a 500 mM, valorándose en ellas la actividad de síntesis de N-acetil hexosaminas. Los resultados obtenidos se expresan en la figura 3.

Para extractos libres de células aparecen tres picos de proteínas con actividad N-acetil hexosamina sintetasa mientras que en el medio aparecen solamente dos picos coincidentes con el segundo y tercero mostrados en los extractos libres de células.

Aunque las reacciones de síntesis *in vitro* se utilice glucosa como sustrato, el método no es específico para N-acetil glucosamina y al poder no ser absolutamente específicas las sintetasas para las diferentes N-acetil hexosaminas, se puede pensar que los distintos picos encontrados podrían corresponder a tres enzimas distintos, una de las cuales sintetizaría N-acetil glucosamina. Para investigar este punto se hicieron otros dos cultivos en las mismas condiciones pero substituyendo glucosa por galactosa o manosa en las mismas concentraciones. Los resultados obtenidos por filtración a través de Sephadex G-200 de los extractos libres de células obtenidos a partir de cultivos de ocho horas de crecimiento se expresan en la misma figura 3. Por comparación con el diagrama de elución anteriormente descrito, se observa que el pico de proteína con actividad enzimática eluido a los 110 ml de filtrado en extractos acelulares de bacterias cultivadas sobre glucosa se muestra impar, siendo repetitivos los correspondientes a las fracciones eluidas a 50 y 70 ml de filtrado en células crecidas tanto sobre galactosa como sobre manosa.

DISCUSIÓN

Las actividades de síntesis de hexosaminas y N-acetil hexaminas estarían involucradas en la formación de paredes celulares, estando en función de la presencia de sulfato amónico en los medios de cul-

tivo. El aumento en la actividad de ambos sistemas enzimáticos endocelulares proporciona un crecimiento activo a la población bacteriana y está acompañado de poca o nula excreción de los enzimas al medio de cultivo. Sin embargo, al sustituir sulfato amónico por glutamina, verdadero sustrato de la reacción enzimática, la actividad de ambos enzimas endógenos desciende, haciéndose nula la que conduce a N-acetil hexosaminas. Esto está en relación con la falta de crecimiento de la población bacteriana, ya que la ausencia de actividades enzimáticas endocelulares no permitiría la formación de suficientes cantidades de hexosaminas para sustentar el crecimiento de las paredes celulares. En este caso, sin embargo, no puede hablarse de anulación de la síntesis de dichos enzimas, sino de su excreción polarizada a los medios de cultivo.

Una posible explicación de estos fenómenos podría ser el que se tratara de dos enzimas distintos. Sin embargo, los resultados obtenidos por filtración a través de Sephadex G-200 parece indicar lo contrario.

Se han tratado de aislar las tres actividades enzimáticas encaminadas a la síntesis de tres N-acetil hexosaminas distintas. Creemos que la actividad N-acetil glucosamina sintetasa está bien caracterizada, eluyendo en la misma fracción sea cual sea su localización. Los dos picos de elución que no corresponden al citado podrían corresponder a enzimas de síntesis de N-acetil galactosamina y N-acetil manosamina, ya que se sintetizan preferentemente en bacterias que crecen sobre galactosa y manosa respectivamente. De la misma manera que para la N-acetil glucosamina sintetasa, existen dos poblaciones enzimáticas, una endocelular y otra exocelular, aparentemente sintetizadas por idéntico proceso y teniendo el mismo tamaño molecular.

RESUMEN

La aparición de enzimas que sintetizan hexosaminas y N-acetil hexosaminas en células de *Proteus mirabilis* que crecen sobre glucosa es máxima cuando se utiliza sulfato amónico como fuente de nitrógeno. Su sustitución por glutamina no impide la síntesis de ambos enzimas, pero estos son preferentemente excretados al medio. Los sistemas enzimáticos para síntesis de N-acetil hexosaminas detectados parecen estar constituidos por tres proteínas distintas que parecen producir preferentemente N-acetil glucosamina, N-acetil galactosamina y N-acetil manosamina.

El enzima que sintetiza N-acetil glucosamina es una única proteína, tanto si es endocelular como exocelular.

SUMMARY

Appearance of enzymes which synthesize hexosamines and N-acetyl hexosamines in *Proteus mirabilis* growing on glucose is maximum when ammonia sulfate is used as nitrogen source. Glutamine in the media permits the synthesis of both enzymatic systems but they are excreted to the media. The enzymatic systems for N-acetyl hexosamines synthesis content three distinct proteins, one of them producing N-acetyl glucosamine.

REFERENCIAS

- Costerton, J. W., Ingram, J. M., Cheng, K. J. — 1974 — *Bacteriol Rev.*, 38, 87.
Dische and Borenfreund — 1950 — In «Methods in Enzymology», 3, 95 — Academic Press — New York.
Lowers, D. A., Rogers, H. T. — 1956 — *Biochem. J.*, 62, 304.
Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. — 1951 — *J. Biol. Chem.*, 193, 265.
Magaña, I., Ruiz, J. — 1967 — *J. Bacteriol.*, 93, 1,294.
Martin, H. H., Kempes, S — 1970 — *J. Bacteriol.*, 102, 347.
Whiteside, T. L., Corpe, W. A. — 1969 — *J. Bacteriol.*, 97, 1,449.