

11261
Tej
5

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

REGULACION DE LA SINTESIS DE QUITINA EN *Neurospora crassa*

TESIS QUE SE PRESENTA PARA LA OBTENCION DEL GRADO

MAESTRO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

AREA DE

BIOLOGIA MOLECULAR

POR

ANGEL ZARAIN HERZBERG

- 1982 -

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

	PAGINA
Lista de Figuras	V
Lista de Tablas	VII
Lista de Abreviaturas	VIII
Agradecimientos	IX
Vita y Publicaciones	X
Resumen	XI
I. INTRODUCCION.....	1
A. Generalidades sobre la Pared Celular.....	1
B. Estructura química de la Pared Celular.....	2
C. Arquitectura de la Pared Celular.....	5
D. Biosíntesis de Quitina	8
E. Objetivos del presente trabajo.....	19
II, MATERIALES Y METODOS.....	21
1. Materiales químicos.....	21
2. Medio de cultivo	22
3. Soluciones amortiguadoras.....	24
4. Crecimiento y preparación de <i>Neurospora crassa</i>	24
5. Ensayos.....	26
III. RESULTADOS.....	31
A. Demostración de la existencia de una actividad inhibitoria de la quitina sintetasa en <i>Neurospora crassa</i>	31
B. Reversibilidad del efecto inhibitorio sobre la actividad de la quitina sintetasa	31

C. Purificación parcial de la actividad inhibitoria de la quitina sintetasa de <i>N. crassa</i>	37
D. Mecanismo de acción de la actividad inhibitoria de la quitina sintetasa	46
E. Análisis cromatográfico de los productos de reacción obtenidos por la acción de la quitinasa sobre quitina preformada	53
F. Ensayo de la actividad de quitinasa empleando oligosacáridos de quitina como sustrato	58
G. Distribución de la actividad de quitinasa en <i>N. crassa</i> ...	61
H. Ensayo de la actividad de quitinasa en el medio de cultivo	63
I. Estabilidad a la temperatura	63
J. Digestión proteolítica	66
K. Determinación de pH óptimo	66
L. Determinación del peso molecular de la quitinasa en <i>N. crassa</i>	69
IV. DISCUSION.....	75
BIBLIOGRAFIA.....	83

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PAGINA
1	Estructuras de la pared celular y del septo de una hifa de <i>Neurospora crassa</i>	7
2	Vía metabólica para la síntesis de quitina	12
3	Esquema propuesto para la activación de la quitina sintetasa de la levadura	18
4	Efecto del citosol sobre la actividad de quitina sintetasa	34
5	Purificación de la actividad inhibitoria de quitina sintetasa por filtración en Sephadex G-100	39
6	Purificación de la actividad inhibitoria por filtración en Sephadex G-25	42
7	Efecto de la actividad inhibitoria purificada sobre la quitina sintetasa	44
8	Cromatografía en placa fina de DEAE-celulosa de los productos obtenidos por la acción de la preparación de inhibidor sobre la quitina naciente	48
9	Cromatografía en placa fina de DEAE-celulosa de los productos obtenidos por acción de la preparación de inhibidor sobre quitina	51
10	Cromatografía en papel de los oligosacáridos liberados por acción de la quitinasa a partir de quitina naciente	55
11	Cromatografía en papel de los oligosacáridos liberados por acción de la quitinasa a partir de quitina preformada	57
12	Cromatografía en papel de los productos liberados por acción de la quitinasa a partir de oligosacáridos de quitina	60
13	Efecto de la adición del medio de cultivo sobre la actividad de quitina sintetasa	65
14	Perfil de actividad de la quitinasa de <i>N. crassa</i> a diferentes valores de pH	68
15	Cromatografía analítica en Ultrogel Aca-54 de la quitinasa purificada	72

Cont...

FIGURA

PAGINA

16	Determinación del peso molecular de la quitinasa parcialmente purificada de <i>N. crassa</i>	74
----	---	----

LISTA DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I	Efecto de la adición de citosol sobre la actividad de la quitina sintetasa	32
II	Demostración de la reversibilidad del efecto inhibitorio sobre la actividad de quitina sintetasa...	36
III	Resumen de la purificación de la actividad inhibitoria de quitina sintetasa de <i>N. crassa</i>	45
IV	Efecto de la actividad de quitina presente en las preparaciones de inhibidor de <i>Neurospora crassa</i> sobre quitina naciente o preformada	52
V	Distribución de la actividad de quitinasa en fracciones subcelulares de <i>Neurospora crassa</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-SCoA	Acetil Coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
DEAE	Dietyl amino etil
EDTA	Acido etilen diamino tetraacético
Fructosa 6vP	Fructosa 6, fosfato
Glucosa 6vP	Glucosa 6, fosfato
Glucosamina 6vP	Glucosamina 6, fosfato
GlcNAc 6vP	N-acetil-D-glucosamina 6, fosfato
GlcNAc 1vP	N-acetil-D-glucosamina 1, fosfato
HSCoA	Coenzima A reducida
PP	Pirofosfato
rav	radio promedio
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UDP-GlcNAc	Uridina difosfato N-acetil-D-glucosamina

AGRADECIMIENTOS

Deseo dar las gracias a los miembros del Jurado que revisaron esta Tesis. Un agradecimiento especial para Analine Morales Soto por su valiosa asistencia secretarial. Al compañero Octavio Ramírez Rojas por sus observaciones acerca de este trabajo, y al Dr. Edgardo Escamilla Marván por su colaboración en el desarrollo de técnicas de purificación de proteínas. Doy las gracias de manera muy especial a mi maestro el Dr. Angel Arroyo Begovich por su guía y asesoramiento durante el desarrollo de esta Investigación.

VITA

NOMBRE : Angel Zaráin Herzberg
FECHA DE NACIMIENTO: 2 de Agosto de 1956
LUGAR DE NACIMIENTO: México, D.F.

1974 Diploma de Estudios Preparatorios.
Plantel "Antonio Caso", E.N.P.

1981 Título de Médico Cirujano.
Facultad de Medicina, UNAM.

PUBLICACIONES

- Propiedades de una actividad inhibitoria de quitina sintetasa en *Neurospora crassa*. (1978) Zaráin Herzberg, A. & Arroyo Begovich, A. Memorias de la XII Reunión de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.
- Purificación y caracterización de un inhibidor de la actividad de quitina sintetasa en *Neurospora crassa*. (1980) Zaráin Herzberg, A. & Arroyo Begovich, A. Memorias de la VII Reunión de Provincia de la Sociedad Mexicana de Microbiología.
- Solubilización de la quitina sintetasa de los quitosomas de *Neurospora crassa*. (1981) Zaráin Herzberg, A. & Arroyo Begovich, A. Memorias de la II Reunión de la Bioenergética y Biomembranas de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.

RESUMEN

La pared celular de los hongos tiene como función principal la de brindar protección a la célula. La resistencia mecánica de la pared está dada por la presencia de polisacáridos. En el hongo *Euscomycete Neurospora crassa* el polisacárido quitina contribuye en forma importante a dar resistencia a la pared. Se ha propuesto que existe regulación tanto espacial como temporal sobre la síntesis y degradación de los polisacáridos que forman a la pared, regulación que permita el crecimiento del organismo al permitir que la pared crezca sin que ésta pierda su resistencia mecánica; en consecuencia fue de interés el estudio de la regulación de la síntesis de quitina en este hongo:

Con el objeto de examinar el mecanismo por el cual se encuentra regulada la síntesis de quitina, se investigó la presencia de inhibición de la quitina sintetasa, en vista de que esta es la enzima responsable de la síntesis de este polímero. Se encontró presente una actividad aparentemente inhibitoria para la quitina sintetasa; dicha actividad se encontró localizada principalmente en el citosol del organismo, y se le purificó parcialmente por medio de precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel. Se encontró que la preparación de inhibidor purificado poseía actividad de quitinasa, la cual fue capaz de hidrolizar tanto a quitina naciente como a quitina preformada. La utilización del substrato de la enzima quitina sintetasa (UDP-N-acetil-D-glucosamina) no se modificó por la presencia de la preparación purificada de inhibidor, aunque la quitina formada en el sistema fue degradada hasta N-acetil-D-glucosamina, N-N²-diacetilquitobiosa, y otros oligosacáridos de mayor

tamaño. La actividad de quitinasa purificada exhibió un peso molecular aparente de 20,600 daltones cuando se analizó por filtración en gel. El pH óptimo de la quitinasa de *N. crassa* fue de 6.7.

Se concluyó que la actividad inhibitoria de quitina sintétasa observada fue debida a la presencia de actividad de quitinasa, la cual exhibió propiedades tanto de endoquitinasa como de exoquitinasa.

I. INTRODUCCION

A. GENERALIDADES SOBRE LA PARED CELULAR

La pared celular de los hongos ha sido estudiada desde diversos puntos de vista, por lo cual existen muchas revisiones sobre el tema, (Aronson, 1965; Ballou, 1976; Bartnicki-García, 1968, 1971, 1973; Cabib, 1975; Gander, 1974; Gooday, 1977; etc.). En estas revisiones se citan cientos de trabajos, entre ellos, se nota un creciente interés e importancia de los estudios acerca de la biosíntesis de la pared celular. El objetivo central de estos estudios ha sido explicar el mecanismo de biosíntesis de los componentes de la pared celular, y además, intentar aclarar algunos de los fenómenos biológicos relacionados con la superficie celular, entre los que destacan: la interacción célula-célula, la respuesta inmune del huésped hacia algunos componentes de hongos patógenos, la morfogénesis, la resistencia a las drogas, etc.

La pared celular tiene como característica primordial en los hongos, brindar protección a la célula, además de ser responsable de las diversas morfologías que adopta el organismo durante diversas condiciones funcionales, como son: la germinación, el crecimiento vegetativo, la invasividad del huésped, etc. En términos muy simples, Bartnicki-García (1968), sugiere que el desarrollo morfológico de los hongos puede ser visto como un problema de morfogénesis celular.

B. ESTRUCTURA QUIMICA DE LA PARED CELULAR

Las propiedades fundamentales de la pared celular de los hongos, como son su resistencia mecánica y su morfología característica, se encuentran relacionados a través de su composición química con la morfogénesis y con la taxonomía de ellos (Bartnicki-García, 1968).

Se ha demostrado que la mayoría de los hongos contienen en su pared celular polisacáridos; en algunos hongos, estos polisacáridos alcanzan hasta un 80-90% de su peso seco total. Entre estos polisacáridos destacan los polímeros de aminohexosas, hexosas, ácidos hexourónicos, metil pentosas, etc. La celulosa y otras glucanas son homopolímeros de glucosa muy frecuentes en la pared celular de los hongos. La quitina y la quitosana son homopolímeros de N-acetil-D-glucosamina (Glc NAc) y glucosamina respectivamente. Otros azúcares se encuentran en los homo y heteropolisacáridos, generalmente formando complejos con proteínas. Las propiedades físicoquímicas de estos polisacáridos influyen en su función dentro de la pared celular, por ejemplo, los polisacáridos cristalinos como la α -quitina y las β -glucanas son responsables de la resistencia mecánica de la pared celular, mientras que los homo y los heteropolisacáridos que son amorfos se asocian a las proteínas funcionando como determinantes antigénicos de la pared celular (Gander, 1974).

Bartnicki-García (1968, 1970) ha establecido una correlación entre la composición química de la pared celular y la clasificación taxonómica de los hongos. En ella divide a los hongos en ocho grupos, en base a la composición química de la pared; en general, esta clasificación concuerda con la de otros autores que han clasificado a los hongos en base a criterios filogenéticos. De acuerdo con la clasificación que

propone este autor, los polímeros más importantes que se encuentran presentes en la pared celular de los hongos Chitridiomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes, y Deuteromycetes son la alfa quitina (polímero de N-acetil-D-glucosamina con enlaces beta 1,4) y las glucanas (polímeros de glucosa con enlaces beta 1,3 y beta 1,6). En los hongos Acrasiales, los componentes más importantes de la pared celular son la celulosa (polímero de glucosa con enlaces beta 1,4) y el glucógeno (polímero de glucosa con enlaces alfa 1,4). Los hongos Oomycetes contienen celulosa y glucanas; los hongos Hyphochitridiomycetes contienen celulosa y quitina; los hongos Zygomycetes contienen quitosana (polímero de D-glucosamina con enlaces beta 1,4) y quitina; los Trichomycetes y Rhodotrylaccae contienen poligalactosamina y galactana (polímero de galactosa); en las levaduras, los polisacáridos más importantes son las glucanas y las mananas o quitina y mananas.

El patrón de construcción de la pared celular determina la forma de la célula en la mayoría de los hongos. Este se hace aparente en los hongos dimórficos, por ejemplo en *Mucor rouxi* la forma micelial del hongo es el resultado de un patrón polarizado del crecimiento de la pared. En la forma micelial existe un gradiente definido de síntesis de la pared, el crecimiento es máximo en la punta de la célula tubular, la cual crece apicalmente, y conforme la hifa tubular se elonga, el grosor de la pared se mantiene uniforme. En contraste, la forma de la levadura es esférica y se expande isodiametralmente mediante el depósito de los componentes de la pared celular uniformemente en toda su superficie; además, existe un aumento gradual en el grosor de la pared celular conforme la levadura aumenta de tamaño. Es posible que estos dos patrones de construcción de pared celular en los hongos estén

determinados por un control espacial y temporal sobre la síntesis de las microfibrillas de polisacáridos de la pared. Las interrogantes principales en el proceso de formación de la pared celular de los hongos son:

- 1. Los mecanismos moleculares de biosíntesis de los componentes de la pared.
- 2. La participación de estructuras celulares en los procesos de biosíntesis de la pared, así como el sitio donde actúan o participan.
- 3. La participación de enzimas líticas en los procesos de formación de la pared.
- 4. Aspectos regulatorios a diferentes niveles.
- 5. La formación de la pared en relación con el desarrollo morfológico de la célula.

Los métodos de investigación utilizados para abordar estos enfoques van desde métodos puramente químicos y físicos hasta métodos bioquímicos y citológicos.

C. ARQUITECTURA DE LA PARED CELULAR

La especialización funcional de cada uno de los componentes de la pared celular se refleja en su localización dentro de su estructura. Estudios de citoquímica, microscopía electrónica y difracción de rayos-X combinados con resultados de análisis químicos y enzimáticos, indican que existe cierto grado de estratificación en la pared celular de los hongos (Potgieter y Alexander, 1965; Vorisek y Pokorny, 1975; Trinci, 1978). El aspecto general de la superficie externa de la pared es liso o ligeramente granulado y está compuesto de material amorfo, que generalmente está constituido por glicoproteínas, mientras que la superficie interna tiene un aspecto microfibrilar debido a la presencia de las fibrillas de polisacáridos que constituyen el esqueleto de la pared. Los espacios interfibrilares de la capa interna de la pared están rellenos de material amorfo, éste probablemente de la misma composición química que el de la capa externa de la pared. Este material amorfo también penetra hasta el espacio periplásmico, en donde algunos de sus constituyentes exhiben diferentes actividades enzimáticas. (Hunsley y Kay, 1976; Cassone, 1973; Ballou y col., 1974). La figura 1 muestra en forma esquemática la estructura de la pared celular y del septo de una hifa de *Neurospora crassa*.

Figura 1

Estructuras de la pared celular y del septo de una hifa de *Neurospora crassa*. (Reproducido de Trinci, 1978).

Zona de extensión
primaria de la
pared

E

Zona de rigidifica-
ción de la pared.
Grosor 50 nm

R

Formación
secundaria de la
pared

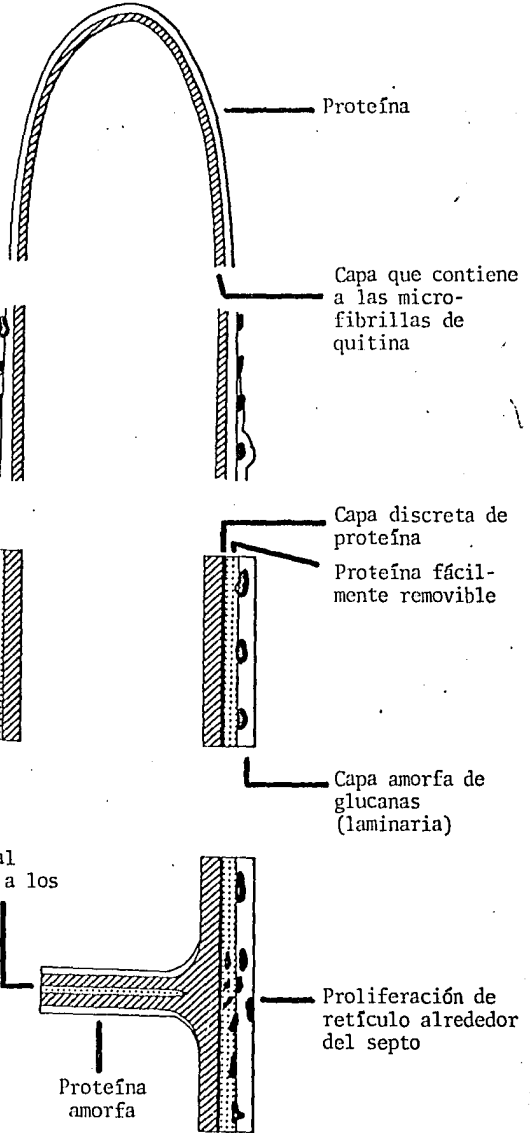
S

Zona madura de la
pared.
Grosor (125 nm)

M

Zona transversal
de formación de la
pared

C



Proteína

Capa que contiene
a las microfibrillas de
quitina

Capa discreta de
proteína
Proteína fácil-
mente removible

Capa amorfa de
glucanas
(laminaria)

Capa central
transparente a los
electrones

Proliferación de
retículo alrededor
del septo

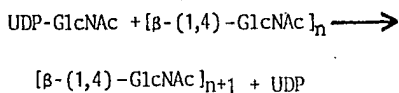
Proteína
amorfa

D. BIOSINTESIS DE QUITINA

La quitina es un polímero lineal de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) que se encuentra extensamente distribuido en la naturaleza, especialmente en invertebrados marinos, insectos, hongos y levaduras. La quitina, al igual que la celulosa, es insoluble en solventes orgánicos, es cristalina y se encuentra orientada en su estado natural, lo cual sugiere la existencia de un potencial formador de fibras intrínseco en el polímero. Los ácidos fuertes, los fluoroalcoholes y ciertas soluciones salinas hidrotrópicas solubilizan a la quitina y en algunos casos también la desacetilan e hidrolizan en diversos grados (Austin y col., 1981). Los residuos de N-acetil-D-glucosamina de la quitina se encuentran unidos linealmente por enlaces beta (1,4). Las cadenas de quitina se encuentran asociadas lateralmente entre sí por medio de puentes de hidrógeno, para de esta manera formar microfibrillas de quitina. Se conocen tres formas cristalinas de este polímero: la alfa quitina que tiene una celda unitaria ortorrómbica, en la cual la disposición de las cadenas es antiparalela, y donde las microfibrillas de quitina tienen un diámetro que varía entre 15-150 Å; la beta quitina con celda unitaria monoclinica, en la cual las cadenas de quitina se ordenan en forma paralela; la tercera forma de quitina es la gamma quitina, la cual no ha sido estudiada suficientemente. Se ha demostrado invariablemente que la alfa quitina es la forma que se encuentra más ampliamente distribuida en la naturaleza. La alfa quitina es el componente principal del exoesqueleto de los insectos, además se encuentra presente en hongos y animales. Su principal función en los hongos es estructural, brindando soporte a la pared celular del organismo. La biosíntesis de quitina in vitro fue

demostrada por primera vez por Glaser & Brown (1957), quienes encontraron que una preparación libre de células de micelio de *Neurospora crassa* catalizaba la incorporación de unidades de GlcNac a partir de uridina 5-difosfato-N-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNac) en un polímero cuyas características correspondían a la alfa quitina.

La ecuación general para la reacción de la síntesis de quitina es:



La reacción requiere de cationes divalentes (Mg^{2+} o Mn^{2+}) y de GlcNac como activadores de la reacción. La enzima que cataliza esta reacción es la UDP-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa: quitina 4-beta-acetamido desoxiglucosiltransferasa (E.C.2.4.1.16), conocida bajo el nombre trivial de quitina sintetasa. Los resultados obtenidos con diferentes preparaciones de enzima de diferentes organismos indican que la quitina sintetasa es una enzima alostérica, la cual contiene más de un sitio de unión por molécula. La transferencia de GlcNac desde UDP-GlcNac a una molécula aceptora parece suceder en un solo paso. Sin embargo, la presencia de un aceptor endógeno no es absolutamente necesaria para que ocurra la reacción.

Ha sido investigada la posibilidad de que una molécula lipídica participe como intermediario de la reacción de la quitina sintetasa. En algunos sistemas biológicos, la síntesis de polisacáridos complejos como por ejemplo mananas, ocurre por glicosilación mediada por lípidos o por glicosilación directa. Los azúcares ligados a lípidos están involucrados en la síntesis de envolturas celulares, paredes celulares, complejos glicoproteína-pared celular, y glicoproteínas en una gran

variedad de procariotes y eucariotes (Waechter y Lennarz, 1976; Elbein, 1979). El componente lipídico que participa en estos sistemas como una coenzima, actúa como un intermediario y funciona en un proceso cíclico. Usualmente, la coenzima lipídica es un poliprenol fosforilado, a menudo dolicol fosfato (Hemming, 1978).

Por otra parte, se ha sugerido que los lípidos no participan directamente en la síntesis de quitina en los hongos, debido a que varios intentos para detectar un lípido intermediario en el sistema han sido infructuosos. Por lo anterior se ha aceptado que en general la quitina se sintetiza por transferencia directa de unidades de GlcNAc desde UDP-GlcNAc al polímero en crecimiento. Existe evidencia de la estimulación de síntesis de quitina por fosfolípidos en el hongo *Mucor rouxii* y en *Saccharomyces* (McMurrough y Bartnicki-García, 1971; Durán y Cabib, 1978).

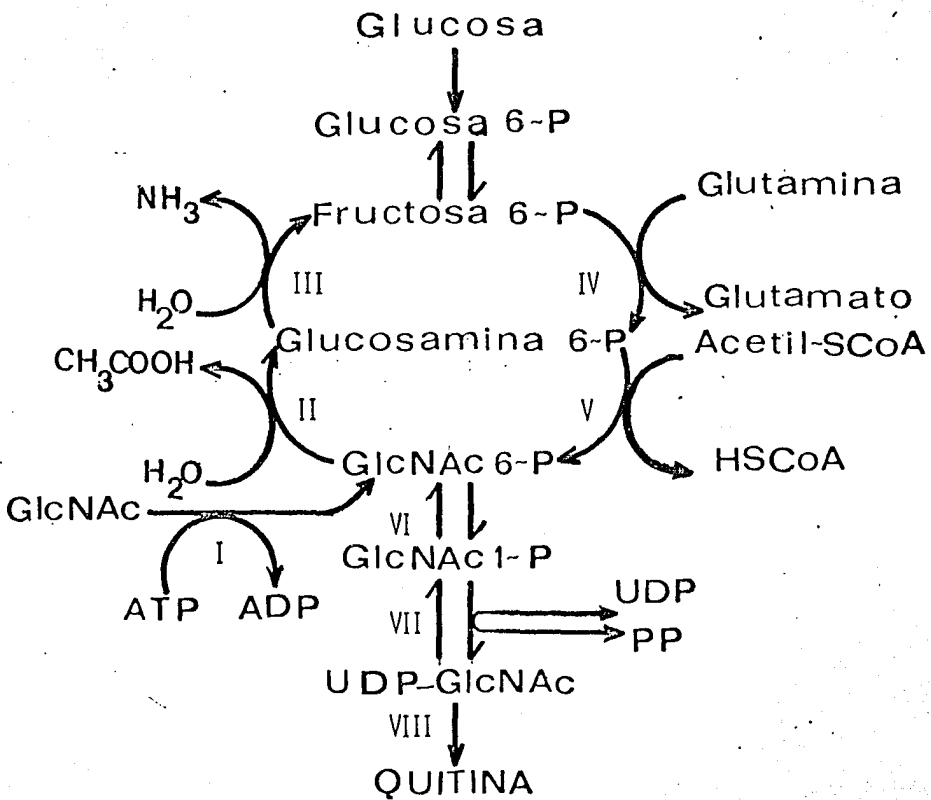
En *Blastocladiella emersonii* la presencia de un lípido juega un papel necesario durante el depósito de quitina en la superficie de las esporas en proceso de enquistamiento. Se trata de un glicolípido, como lo son los lípidos involucrados en la síntesis de otros polisacáridos en la pared celular de otros organismos. Sin embargo, el glicolípido en *B. emersonii* no es un poliprenol fosforilado como sucede en la síntesis de mananas, sino que más aún este lípido no funciona como intermediario en un proceso cíclico, sino que parece actuar como un aceptor lipídico sobre el cual el polímero de quitina se construye (Mills y Cantino, 1980).

En párrafos anteriores, se mencionó que la quitina sintetasa es una enzima alostérica, en la cual actúan como efectores alostéricos positivos tanto la GlcNAc como la N-N'-diacetilquitobiosa y algunas N-acetilquitodextrinas (McMurrough y col., 1971; Peberdy y Moore, 1975). El UDP que

Figura 2

Vía metabólica para la síntesis de quitina. Las enzimas involucradas en el metabolismo de la N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y de la síntesis de quitina son: (I) N-acetil-D-glucosamina kinasa; (II) N-acetil-D-glucosamina-6-fosfato desacetilasa; (III) glucosamina-6-fosfato desaminasa; (IV) glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa; (V) glucosamina-fosfato acetiltransferasa; (VI) glucosamina-fosfato isomerasa; (VII) UDPacetilglucosamina pirofosforilasa; (VIII) quitina sintetasa.

(Reproducido de Shepherd y col., 1980)



es un producto de la reacción de síntesis de quitina actúa como efector alostérico negativo de la enzima con una K_i aparente de 0.6 mM. La polioxina D es un antibiótico pirimídico que actúa como inhibidor potente de la quitina sintetasa de los hongos. La inhibición de la quitina sintetasa por polioxina D es del tipo competitivo con respecto al sustrato UDP-GlcNAc, su K_i (1 μ M) es 2-3 órdenes de magnitud menor que la K_m para el sustrato. El mecanismo de inhibición por la polioxina D se explica por la similitud estructural que tiene con el UDP-GlcNAc, lo que sugiere que compite por el sitio activo de la enzima (Gooday, 1977; Hori y col., 1974; Endo y col., 1970; etc.).

La quitina sintetasa muestra cooperatividad positiva con respecto al UDP-GlcNAc y es posible que esta enzima esté involucrada en la regulación de la morfogénesis celular. Las propiedades del sistema de incorporación de GlcNAc y de las enzimas responsables de su metabolismo sugieren que la partición de la GlcNAc entre la síntesis de la pared celular (por tanto de quitina) y su catabolismo vía fructosa-6-fosfato es un hecho crucial en la morfogénesis (Shepherd y col., 1980a). En la figura 2 se muestra la vía metabólica para la biosíntesis de quitina. Se ha demostrado en *Candida albicans* que la enzima responsable de la partición de GlcNAc es la GlcNAc kinasa, ésta es una enzima inducible (Sigh y Datta, 1978). Otro posible punto de control en la biosíntesis de la pared celular se encuentra a nivel de la quitina sintetasa, la cual por ser una enzima de membrana se ve afectada en su actividad por el contenido de lípidos en esta, particularmente de esteroides, los cuales disminuyen la actividad de quitina sintetasa (Shepherd y col., 1980b). Cuando se examina bajo el microscopio electrónico al producto de reacción de la quitina sintetasa, se observan mallas regulares de

microfibrillas largas con un diámetro aproximado de 20 nm muy similares a las paredes formadas in vivo (Ruíz-Herrera y Bartnicki-García, 1974). El material sintetizado se tiñe intensamente con el colorante fluorescente específico para polisacáridos fibrilares Calcofluor M 2R. El análisis de difracción de rayos-X ha probado de manera concluyente, que el producto biosintetizado fue alfa quitina. La cristalinidad observada para la quitina sintetizada por la quitina sintetasa in vitro fue comparable a la de la quitina pura obtenida de *Cancer magister*.

Como se ha mencionado anteriormente, los hongos filamentosos crecen por extensión de la punta de la hifa. Esta propiedad se considera el resultado de la fusión de vesículas que contienen las enzimas sintetizantes de la pared celular con la membrana plasmática en la zona apical de la hifa (Bartnicki-García y col., 1979). Las microfibrillas de quitina pueden ser sintetizadas in vitro por preparaciones de quitina sintetasa obtenidas de diversos hongos (Bartnicki-García y col., 1978).

1. Chytridiomycetes: micelio de *Allomyces macrogynus*.
2. Zygomycetes: micelio de *Mucor rouxii*.
3. Hemiacomycetes: levadura de *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Euascomycetes: micelio de *Neurospora crassa*.
5. Homobasidiomycetes: basidiospora de *Agaricus bisporus*.

En todos los casos se ha encontrado que aparentemente unas vesículas de 40-70 nm de diámetro son las responsables de la biosíntesis de las microfibrillas in vitro (Bracker y col., 1976). A estas estructuras microvesiculares se les considera los contenedores de la quitina sintetasa en la célula, donde transportan a la enzima hasta su destino en la superficie celular.

Ruíz-Herrera y col., (1975) han propuesto que para que se forme una microfibrilla de quitina es necesario que las cadenas moleculares de quitina sean sintetizadas y ensambladas colectivamente en el interior del quitosoma, para que posteriormente, al fundirse éste con la membrana plasmática en la zona apical de la hifa, se depositen las microfibrillas de quitina en la zona de crecimiento de la pared celular, en el exterior de la célula.

Un mecanismo diferente ha sido propuesto para explicar la localización de la síntesis de pared celular alrededor de la zona de gemación en la levadura. Cabib y Farkas (1971) han encontrado que en *Saccharomyces* la quitina sintetasa está distribuida uniformemente en la membrana plasmática en forma zimogénica, y la activación local del zimógeno por proteasas que llegan a los sitios específicos de síntesis de pared contenidas en vesículas, permiten que la síntesis de quitina ocurra en una localización precisa alrededor de la zona de gemación.

Tanto la quitina sintetasa presente en los quitosomas como la que se localiza en la membrana plasmática, se encuentran predominantemente en forma inactiva o zimogénica, la cual puede ser activada por proteólisis limitada (Cabib y Farkas, 1971; Ruíz-Herrera y Bartnicki-García, 1976; Ryder y Peberdy, 1977; Isaac y col., 1978; Arroyo-Begovich y Ruíz-Herrera, 1979). El carácter zimogénico de la enzima ha sido confirmado en preparaciones de quitina sintetasa disociada de los quitosomas mediante el uso del detergente digitonina (Ruíz-Herrera y Bartnicki-García, 1974).

Los zimógenos de quitina sintetasa de varios hongos requieren de la acción de diferentes tipos de proteasas. La forma zimogénica de *Mucor rouxii* se activa mejor con remilasa (preparación cruda de proteasas

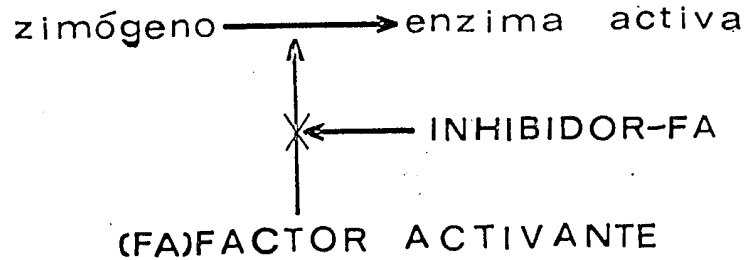
ácidas de *Mucor miehei*) que con tripsina (proteasa neutra); por el contrario, la forma zimogénica de *Neurospora crassa* y de *Agaricus bisporus* responden mejor a la acción de tripsina que a la de renilasa. De acuerdo con lo anterior, se ha sugerido que la quitina sintetasa se produce en la célula en forma de zimógeno (Bartnicki-García y col., 1979; Arroyo-Begovich y Rufz-Herrera, 1979). La existencia de una forma activa y otra inactiva de quitina sintetasa en la célula, sugiere que, posiblemente in vivo, la célula determine el sitio donde han de sintetizarse las microfibrillas de quitina mediante un mecanismo de proteólisis controlada; por ejemplo, en *Saccharomyces* se ha reportado la existencia en el citosol de una proteína termoestable de carácter soluble. Esta proteína es capaz de unirse selectivamente a una proteasa denominada factor activante (FA), e inhibir su actividad como consecuencia. Esta proteasa ha sido identificada como la proteinasa B, esta es la proteasa que activa a la quitina sintetasa zimogénica en la levadura, de tal forma que la proteína termoestable de peso molecular aproximado de 8,500 daltones funciona como un inhibidor de la síntesis de quitina por interferir directamente con el proceso de activación del zimógeno (Cabib y Parkas, 1971). La figura 3 muestra un esquema para la activación de la quitina sintetasa de levadura propuesto por Cabib y col. (1973).

Por otra parte, López-Romero y col. (1978) reporta la presencia de una proteína soluble en el citosol de la forma de levadura de *Mucor rouxii* que es capaz de inhibir la síntesis de quitina in vitro. En contraste con el inhibidor de *Saccharomyces*, el inhibidor de *Mucor rouxii* no interfiere con la activación proteolítica de la quitina sintetasa zimogénica, por lo que se ha postulado que esta proteína inhibitoria inhiba directamente a la quitina sintetasa en su forma activa (McMurrugh y Bartnicki-García, 1973; López-Romero y Rufz-Herrera, 1976).

Figura 3

Esquema propuesto para la activación de la quitina sintetasa de levadura. (Reproducido de Cabib y col., 1973).

QUITINA SINTETASA



E. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

Neurospora crassa es un hongo Euascomyceto que se distingue de otros hongos principalmente por formar ascosporas, estructuras que son la forma de reproducción sexual del organismo. Este hongo posee micelio vegetativo compuesto por hifas septadas que se ramifican profusamente y que contienen de uno a varios núcleos por célula. Existen poros en la pared del hongo a nivel de los septos que comunican las células adyacentes y que permiten el paso de los núcleos y de material citoplásmico entre una célula y otra. El micelio de *N. crassa* forma esporas vegetativas también llamadas conidias, cuando los nutrientes del medio de cultivo empiezan a agotarse. Estas conidias son la forma de reproducción asexual del organismo.

La pared celular de la hifa madura de la cepa silvestre de *N. crassa*, contiene 25-35% de beta (1,3) glucanas, 8-10% de alfa quitina, 10-15% de proteínas y péptidos, 15-20% de otras glucanas, 2-8% de polímeros de galactosamina y cantidades muy reducidas de otros componentes menores (Potgieter y Alexander, 1965; Mahadevan y Tatum, 1965, 1967; Manocha y Colvin, 1967; Schmit y col., 1975; Cardemil y Pincheira, 1979, etc.), Aunque se conocen las posiciones relativas de varios de los componentes mencionados dentro de la estructura de la pared celular (Mahadevan y Tatum, 1967; Hunsley y Burnett, 1970), el mecanismo de ensamblaje de estos componentes se desconoce totalmente.

Como se mencionó en la sección correspondiente a la biosíntesis de quitina de esta Introducción, la quitina sintetasa es una enzima alostérica en la cual actúan como reguladores alostéricos la GlcNAc, la N-N'-diacetilquitobiosa y las N-acetilquitodextrinas, y el UDP. Por otra parte, se ha reportado la existencia de inhibidores de la

actividad de quitina sintetasa in vitro. En el caso de *M. rouxii* se ha reportado la existencia de un inhibidor de la forma activa de la quitina sintetasa (López-Romero y col., 1978), mientras que en *Saccharomyces* se ha reportado un inhibidor de la activación proteolítica de la quitina sintetasa (Cabib y Farkas, 1971).

N. crassa es un organismo que se encuentra filogenéticamente más relacionado al Ascomycete *Saccharomyces* que al Zygomycete *M. rouxii*. En *N. crassa* no se ha estudiado la regulación de la actividad de la quitina sintetasa por inhibidores como los que han sido descritos para *M. rouxii* y *Saccharomyces*. Por lo anterior, resulta de interés investigar la existencia del mecanismo por el cual se encuentra regulada la actividad de quitina sintetasa en *N. crassa*. De acuerdo con lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivos centrales los siguientes:

1. Investigar la presencia de actividad inhibitoria de quitina sintetasa en *Neurospora crassa*.
2. Identificar y caracterizar a la molécula responsable de la actividad inhibitoria.
3. Investigar el mecanismo de acción por el cual dicha molécula ejerce la inhibición de la síntesis de quitina.
4. Discutir el mecanismo de regulación de la síntesis de quitina involucrado en este hongo.

II. MATERIALES Y METODOS

1. MATERIALES QUIMICOS

- a. PROTEINAS: Tripsina, albúmina sérica bovina, hemoglobina, citocromo c, inhibidor de tripsina de frijol de soya y la quitinasa de *Streptomyces griseus* se obtuvieron de Sigma Chemical (St. Louis, Mo.).
- b. CARBOHIDRATOS: N-acetil-D-glucosamina, UDP-N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-D-glucosamina-6-fosfato, N-acetil-D-glucosamina-1-fosfato y N-N'-diacetilquitobiosa se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.). Quitotriosa y quitotetraosa fueron preparados de acuerdo al método de Rupley, J.A. (1964). La UDP-[^{14}C]-N-acetil-D-glucosamina ($0.029 \text{ Ci mmol}^{-1}$) fue obtenida de New England Nuclear.
- c. GELES PARA FILTRACION: Sephadex-G-25 (fino) y Sephadex G-100 se obtuvieron de Pharmacia Fine Chemicals. Ultrogel ACA-54 se obtuvo de LKB. Biogel A-5m y DEAE-celulosa en polvo (Cellex D) se obtuvieron de Bio-Rad (Richmond, CA.).
- d. PLACAS DE CROMATOGRAFIA: Las placas de cromatografía de capa fina en DEAE-celulosa fueron preparadas como sigue: se trató la resina con HCl 1N por 10 min; luego se lavó con agua destilada dos veces; a continuación se trató con NaOH 1N por 10 min y se lavó con agua destilada tres veces; se resuspendió la resina en NaCl 0.4 M más HCl 0.2 M durante 1 hora y se lavó con agua destilada cinco veces. Finalmente se resuspendió en agua bidestilada más NaN_3 al 0.02% y se guardó en el refrigerador. Las placas se prepararon extendiendo 14 ml de la suspensión de DEAE-celulosa en agua

sobre la placa de vidrio (2,5 x 20 cm) y secándolas a temperatura ambiente por 15 horas.

2. MEDIO DE CULTIVO

a. MEDIO LIQUIDO DE CRECIMIENTO: Se empleó el medio mínimo (N) de Vogel, H.J. (1956). El medio se preparó concentrado 50 veces como se describe a continuación: en 750 ml de agua destilada se le disolvieron sucesivamente bajo agitación constante y a temperatura ambiente las siguientes substancias:

	5 $\frac{1}{2}$ H ₂ O	150	gramos
Na ₃ citrato,	2 H ₂ O	125	gramos
KH ₂ PO ₄ , anhidro		250	gramos
NH ₄ NO ₃ , anhidro		100	gramos
MgSO ₄ , 7H ₂ O		10	gramos
	2 H ₂ O	5	gramos
CaCl ₂ ,	anhidro	3.77	gramos
Elementos Traza (solución)		5	ml
Biotina (solución)		2.5	ml

La solución resultante se ajustó a un volumen de 1 litro. Se agregaron 2 ml de cloroformo como preservativo y el medio resultante concentrado 50 veces se almacenó a temperatura ambiente. Para usarlo se diluyó el medio concentrado 50 veces con agua destilada. Al medio resultante se le denominó medio N. El medio tenía un pH alrededor de

5.8. El medio N se suplementó con sacarosa como fuente de carbono (20 gramos por litro) y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15-20 min.

La solución de elementos traza se preparó como sigue: en 95 ml de agua destilada, se disolvió sucesivamente bajo agitación a temperatura ambiente:

Acido cítrico, 1 H ₂ O (solubilizante)	5.0 gramos
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	5.0 gramos
Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6 H ₂ O	1.0 gramos
CuSO ₄ , 5 H ₂ O	0.25 gramos
MnSO ₄ , 1 H ₂ O	0.05 gramos
H ₃ BO ₃ , ahidro	0.05 gramos
Na ₂ MoO ₄ , 2 H ₂ O	0.05 gramos

El volumen final resultante fue alrededor de 100 ml. Se agregó 1 ml de cloroformo como preservativo, y se almacenó a temperatura ambiente. La solución de biotina se preparó disolviendo 5.0 mg de biotina en 50 ml de agua destilada. La solución resultante se repartió en tubos de ensayo y se almacenó congelada.

- b. MEDIO SOLIDO DE CRECIMIENTO: Medio mínimo (N) más agar al 1.5%. Se colocó caliente en tubos de ensayo con tapas de rosca y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15-20 min. Los tubos se dejaron enfriar en posición inclinada.

3. SOLUCIONES AMORTIGUADORAS

AMORTIGUADOR A. TRIS (base) 0.05 M, $MgCl_2$ 0.01 M, EDTA 0.001 M, Na_3 0.03 M, el pH se ajustó a 8,6 con HCl.

AMORTIGUADOR B. KH_2PO_4 0.05 M, $MgCl_2$ 0.01 M, EDTA 0.001 M, Na_3 0.03 M, el pH se ajustó a 6.1 con NaOH.

4. CRECIMIENTO Y PREPARACION DE *Neurospora crassa*

- a. MANTENIMIENTO DE LA CEPA; En todos los experimentos se empleó la cepa silvestre de *Neurospora crassa* 74-A; ésta se mantuvo en tubos con medio mínimo sólido.
- b. PREPARACION DEL INOCULO: Debido al elevado número de conidias que se requieren para inocular al medio mínimo líquido (N), fue necesario obtenerlas de botellas de Roux que contenían 200 ml de medio sólido. Una vez inoculadas las botellas se incubaron a 30°C los primeros dos días y a continuación se dejaron a temperatura ambiente durante cinco días más en presencia de luz. Una vez maduras las conidias se cosecharon como sigue: se agregó agua destilada esteril (50 ml) dentro de las botellas de Roux que contenían el cultivo maduro, se cerró con tapón de hule estéril y se agitó la botella vigorosamente para resuspender a las conidias. La suspensión se transfirió a otro matraz estéril mediante filtración a través de dos capas de gasa estéril colocadas en un embudo estéril con el propósito de eliminar los fragmentos de micelio. La suspensión de conidias se lavó una vez por centrifugación a 3,000 rpm con agua estéril, finalmente las conidias se suspendieron en un volumen conocido de agua destilada estéril. Las conidias se contaron usando una cámara de Neubauer. Las conidias se inocularon a razón de 1×10^6 conidias por ml.

- c. CRECIMIENTO Y COSECHA: Una vez inoculado el medio (N) líquido con las conidias, se incubó a 30°C durante dos días bajo aereación vigorosa por medio de burbujeo continuo de aire estéril. La cosecha se realizó por filtración a través de dos capas de gasa. El micelio fue fragmentado a mano y liofilizado. El micelio liofilizado fue molido empleando una malla número 60 en un molino Wiley y se almacenó a - 60°C.
- d. OBTENCION DE EXTRACTOS: A dos gramos de micelio en polvo se les resuspendió en 30 ml de solución amortiguadora A (pH 8.6) y se les mezcló con 20 ml de perlas de vidrio (0.45-0.50 mm diámetro) y se les homogeneizó durante un minuto en un homogeneizador de células modelo Brawn MSK, enfriando la mezcla con CO₂ comprimido. Al homogeneizado resultante se le centrifugó a 1,000 g por 5 min para eliminar las paredes celulares y células no rotas; luego se centrifugó a 68,000 g (rav) durante 60 min. El sobrenadante resultante fue la fuente a partir de la cual se purificaron los quitosomas y la actividad inhibitoria de quitina sintetasa.
- e. PURIFICACION DE QUITOSOMAS: El procedimiento de purificación de quitosomas empleado fue una modificación del método descrito por Ruíz-Herrera y col., (1977). Se filtraron 18 ml de la fracción sobrenadante de 68,000 g (rav) a través de una columna de Biogel A-5m (2.5 x 35 cm) previamente equilibrada con amortiguador A. La columna se eluyó con el mismo amortiguador. Se colectaron fracciones de 3 ml. La actividad de quitina sintetasa presente en las fracciones colectadas se determinó tomando muestras de 50 µl. La actividad de quitina sintetasa se encontró localizada en el volumen de exclusión de la columna. Las 5 fracciones que contenían la mayor actividad de quitina sintetasa se

juntaron y se les midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm. Se calculó el contenido de ribosomas por ml de la preparación, considerando que 11 U de absorbancia a 260 nm corresponden a 1 mg de ribosomas por ml. Para eliminar los ribosomas de la preparación se le agregó ribonucleasa a razón de 25 µg por mg de proteína ribosomal y se les incubó durante 15 min a 22°C en la obscuridad; a continuación se le centrifugó a 10,000 g (rav) durante 20 min. La fracción sobrenadante constituyó la preparación de quitosomas que fue utilizada en los ensayos de quitina sintetasa.

5. ENSAYOS

- a. QUITINA SINTETASA: la actividad de quitina sintetasa se ensayó midiendo la incorporación de N'-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) en quitina siguiendo una modificación del procedimiento descrito por Ruiz-Herrera y Bartnicki-García, (1976). Las mezclas estándar de incubación para determinar la actividad de quitina sintetasa contienen en amortiguador A las siguientes sustancias: N-acetil-D-glucosamina 20 mM, UDP-[¹⁴C]-N-acetil-D-glucosamina 0.5 mM (290.0 mCi por mmol) y ATP 0.2 mM, además 10 µl de una solución de tripsina (100 µg por ml) y 25 µl de la preparación de quitosomas (37 µg de proteína) como fuente de quitina sintetasa, en volumen final de 0.125 ml.

Las mezclas estándar de reacción para quitina sintetasa se incubaron normalmente durante 60 min a temperatura ambiente (22°C). La reacción se detuvo en varias formas: por la adición de polioxina D; por la adición de 1 ml de NaOH 1 N o por calentamiento a 75°C durante 5 min. En los casos en que se detuvo la reacción por calentamiento o por adición de polioxina D, el ensayo de los productos de la reacción se llevó a cabo por medio de cromatografía en capa fina en placas de DEAE-celulosa, como se describe

más adelante para el ensayo de quitinasa. La cromatografía en capa fina de DEAE-celulosa permite separar la quitina formada del sustrato (UDP-GlcNAc) no utilizado por la quitina sintetasa, además se logró separar a los oligosacáridos de quitina que fueron producidos durante la reacción.

La radioactividad incorporada en quitina permanece en el origen de la placa cromatográfica aún después de los dos pasos cromatográficos empleados. La zona de la placa que correspondía al origen se desprendió del vidrio y se suspendió en 5 ml de líquido de centelleo no acuoso (100 mg de dimetil POPOP y 2 g de PPO en 1 lt de tolueno) en viales de conteo y la radioactividad incorporada en el material insoluble se determinó por medio de un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri-Carb Modelo 2425 con una eficiencia para ^{14}C de 80.2%. La actividad de quitina sintetasa se expresó como nanomolas de N-acetil-D-glucosamina incorporada por mg de proteína por minuto.

Para ensayar la actividad inhibitoria de quitina sintetasa, la reacción se detuvo por la adición de 1 ml de NaOH 1 N y posteriormente las mezclas se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio (Whatman, grado 934-AH de 24 mm de diámetro). Los filtros se lavaron dos veces con 20 ml de NaOH 1 N y luego dos veces más con 20 ml de una mezcla de lavado compuesta de ácido acético 0.5 N y etanol 95% (4:1) v/v. Los filtros se secaron a 100°C durante 10 min. La radioactividad retenida en los filtros correspondió a la quitina formada por el sistema de ensayo. Esta se cuantificó en la misma forma que la descrita para medir la radioactividad en las placas de DEAE-celulosa. Una unidad de actividad inhibitoria corresponde a la cantidad que causó 1% de inhibición de la actividad de quitina sintetasa.

b. QUITINASA: El ensayo de la actividad de quitinasa en las preparaciones de inhibidor de quitina sintetasa se llevó a cabo siguiendo una modificación del método descrito por Molano y col. (1979). Los substratos empleados fueron tanto quitina preformada como quitina naciente. Para el ensayo en presencia de quitina preformada, primero se dio oportunidad de que se formara quitina en la mezcla de incubación estándar para quitina sintetasa durante 1 hora a 22°C y posteriormente la reacción se detuvo calentando a 75°C por 5 minutos. Entonces se agregó la preparación de inhibidor de quitina sintetasa y se continuó la incubación durante 60 minutos más. La reacción se detuvo por calentamiento a 75°C durante 5 minutos. Para el ensayo de actividad de quitinasa en presencia de quitina naciente, la síntesis de quitina se inició en el momento de agregar la preparación de inhibidor de quitina sintetasa en un sistema de mezcla de reacción estándar para quitina sintetasa. La incubación se continuó durante 60 minutos a 22°C y luego se detuvo la reacción por calentamiento a 75°C por 5 minutos.

El ensayo de los productos de reacción de la quitinasa se llevó a cabo por medio de cromatografía en capa fina en placas de DEAE-celulosa. Las placas se sometieron en primer lugar a cromatografía ascendente empleando agua como solvente. Los oligosacáridos producidos por la reacción de la quitinasa viajan con el frente del solvente mientras que la quitina y el UDP-GlcNAc que no reaccionó permanecen en el origen. Cuando el frente del solvente se acercó a 1 cm del final de la placa se sacaron las placas de la cámara de cromatografía y se secaron en el horno a 100°C por 10 min. Entonces se recortó un segmento de 3 cm de ancho de la película de DEAE-celulosa y se colocó en un vial de centelleo y se le agregó 5 ml de líquido de centelleo no acuoso y se contaron. Las

placas se sometieron a una segunda cromatografía en la misma dirección empleando una solución 0.4 M de NaCl que contenía 0.2 M de HCl como solvente. En esta segunda cromatografía se obtiene la migración del UDP-GlcNAc mientras que la quitina permanece inmóvil en el origen de la placa cromatográfica. Las placas se secaron como en el paso anterior y posteriormente se cortaron segmentos de 1 cm de ancho de la película de DEAE-celulosa y se colocaron en viales de conteo con 5 ml de líquido de centelleo no acuoso para cuantificar la radioactividad distribuida en diferentes zonas de la placa y así poder determinar la posición y cantidad de los compuestos producidos por las enzimas presentes en el sistema de ensayo.

- c. CROMATOGRAFIA EN PAPEL: La cromatografía en papel de los oligosacáridos liberados de la quitina por acción de la quitinasa se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por Powning Irzykiewics (1965), en tiras de papel para cromatografía Whatman 3 MM de 4 x 50 cm. Los cromatogramas se irrigaron de manera descendente con alcohol iso-amílico: piridina: agua (1:1:0.8 v/v) durante alrededor de 15 h. La presencia de azúcares reductores fue detectada sobre los cromatogramas haciendo uso del reactivo de nitrato de plata (Trevelyan y col., 1950).
- d. CROMATOGRAFIA ANALITICA EN GEL: Se utilizaron Ultrogel AcA-54 y una columna de flujo hacia arriba. La longitud de la cama de gel fue 140 x 1.8 cm, y su volumen fue de 356 ml. El volumen excluido se determinó con la molécula de Dextrano Azul 2000 (Farmacia). La curva de selectividad se preparó asumiendo una interrelación similar de forma y peso molecular para todos los estándares usados, así como para la quitinasa.

El valor de K_{av} fue usado como parámetro de elución (Ackers, 1964).

- e. PROTEINA: La determinación de la proteína fue hecha por el método de Lowry y col. (1951). Se utilizó como estándar para las determinaciones a la albúmina sérica bovina, fracción V.

III. RESULTADOS

Con el objeto de investigar la presencia de un inhibidor de la actividad de quitina sintetasa en *N. crassa*, preparaciones enzimáticas de este organismo se ensayaron en presencia o en ausencia de muestras de citosol obtenidas a partir de este mismo organismo. Se utilizó citosol porque esta fracción ha mostrado en el sistema de *M. rouxii* contener la actividad inhibitoria de la quitina sintetasa (McMurrough y Bartnicki-García, 1973; López-Romero y col., 1978).

A. DEMOSTRACION DE LA EXISTENCIA DE UNA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA QUITINA SINTETASA EN *N. crassa*.

En la Tabla I se muestra que en presencia de citosol la actividad de quitina sintetasa aparentemente se inhibió 40%. Cuando se examinó el efecto de la adición de cantidades crecientes de citosol, se encontró que la actividad de la quitina sintetasa solo pudo ser inhibida hasta un máximo de 85% (Fig. 4).

B. REVERSIBILIDAD DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA QUITINA SINTETASA.

En vista del hallazgo de la presencia de actividad inhibitoria de la quitina sintetasa en el citosol de *N. crassa*, resultó de interés investigar si dicha actividad inhibitoria era ejercida de forma reversible o irreversible. Para ello se incubó la preparación de quitosomas de *N. crassa* con tripsina a una concentración final y 1 µg por ml durante 1 min con la finalidad de activar a la quitina sintetasa de los quitosomas;

TABLA I

EFFECTO DE LA ADICION DE CITOSOL SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA
QUITINA SINTETASA

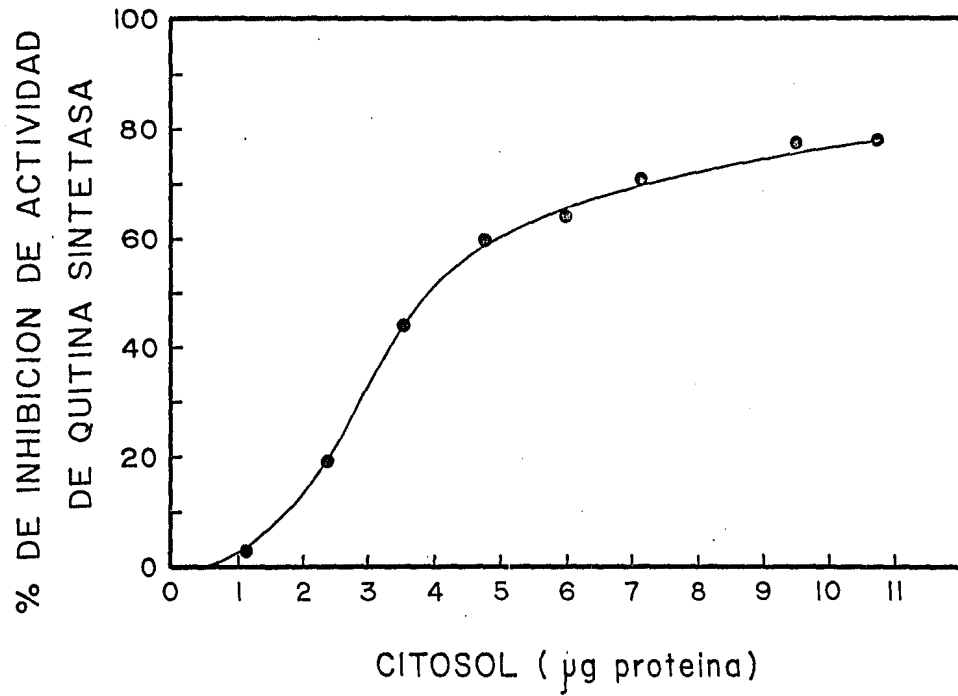
Adiciones	Actividad de la * quitina sintetasa (nmoles min ⁻¹)	Inhibición aparente {
Ninguna	55.0	0
Citosol	33.0	40

La fracción de citosol (10 μ l, 60 ng protefna) fue agregada a la mezcla de ensayo de quitina sintetasa estándar e incubada por 30 min a 22°C. La actividad de la quitina sintetasa se midió como se describe en "Materiales y Métodos".

* nmoles de ¹⁴CGlcNAc incorporadas en quitina.

Figura 4

Efecto del citosol sobre la actividad de quitina sintetasa. Se adicionaron cantidades crecientes de citosol y se midió la actividad de quitina sintetasa residual como se describe en la sección de "Materiales y Métodos".



la mezcla se centrifugó a 160,000 g (rav) durante 60 min a 4°C y se lavó con amortiguador A dos veces para detener la acción de la tripsina. La preparación de quitosomas así activados se incubó durante 30 min a 22°C en presencia de citosol y de la mezcla de reacción para el ensayo de la actividad de quitina sintetasa. Se tomaron muestras de 100 µl, la reacción en ellas se detuvo con NaOH 1 N, las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio como se describe en "Materiales y Métodos". Al resto de la mezcla de incubación se le centrifugó a 160,000 g (rav) para colectar a los quitosomas. Se lavó el precipitado (quitosomas) con amortiguador A dos veces y se resuspendió en un volumen igual al que tenía antes de ser centrifugada. Ahora se ensayó la actividad de quitina sintetasa residual en los quitosomas después de haber eliminado al citosol. Se tomaron fracciones de 100 µl de la suspensión de quitosomas lavados y se les agregó 25 µl de la mezcla de reacción para quitina sintetasa, se incubó esta mezcla durante 30 min a 22°C, se detuvo la reacción de quitina sintetasa añadiendo NaOH 1 N y se cuantificó la quitina formada midiendo la radioactividad retenida en el filtro de fibra de vidrio. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla II, en ella se observa que cuando se incubó la preparación de quitina sintetasa previamente activada en presencia de la preparación de inhibidor (citosol) se logró inhibir en 63.5% la cantidad de quitina formada por la sintetasa con respecto a una preparación control tratada en igual forma pero en ausencia de citosol. Sin embargo, cuando se retiró al inhibidor por medio de lavados no hubo diferencia entre la actividad de quitina sintetasa exhibida por las muestras control no tratadas con citosol y aquellas tratadas con éste. Se observó también que la quitina sintetasa recuperada después de haber eliminado

TABLA II

DEMOSTRACION DE LA REVERSIBILIDAD DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA
ACTIVIDAD DE QUITINA SINTETASA

INHIBICION EN PRESENCIA DE CITOSOL			INHIBICION REMANENTE DESPUES DE LAVAR LA MUESTRA		
Actividad Total (unidades)	% de inhibición		Actividad Total (unidades)	% de inhibición	
224	(613)	63.5*	357	(348)	0*

Los valores entre paréntesis corresponden a la actividad total de quitina sintetasa de la muestra control.

* % de inhibición de la actividad de quitina sintetasa calculado con respecto a la actividad total de una muestra control idéntica, tratada en igual forma pero en ausencia de citosol.

la preparación de inhibidor continuó siendo susceptible a la acción inhibitoria del citosol (datos no mostrados).

Los anteriores resultados indican que el efecto inhibitorio del citosol sobre la síntesis de quitina se efectuó en forma reversible, por tanto, se puede descartar la posibilidad de que este efecto inhibitorio fuera debido a destrucción de la enzima quitina sintetasa, destrucción que era posible por la acción de proteasas que estaban presentes en el citosol que se utilizó.

C. PURIFICACION PARCIAL DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA QUITINA SINTETASA DE *N. crassa*.

PASO I. Todas las operaciones se llevaron a cabo entre 2-4°C. La fracción del citosol obtenida a partir de 10 g de micelio molido (peso seco) se centrifugó a 160,000 g (rav) durante 60 min para eliminar los restos celulares, partículas subcelulares y material insoluble.

PASO II. Al sobrenadante de 160,000 se le agregó sulfato de amonio sólido bajo agitación continua hasta alcanzar 45% de saturación, después de incubar la mezcla 20 min se le centrifugó a 10,000 g (rav) durante 20 min. La fracción precipitada por sulfato de amonio se resuspendió en un volumen de 11 ml de amortiguador A y se dializó contra varios cambios de amortiguador B. Al dializado se le centrifugó a 160,000 g (rav) para remover el material insoluble.

PASO III. Cromatografía en Sephadex G-100. Al sobrenadante obtenido del paso II (13.5 ml) se le aplicó a una columna de Sephadex G-100 (99 × 1.9 cm) previamente equilibrada con el amortiguador B. La elución se llevó a cabo empleando el mismo amortiguador, se colectaron fracciones de 5 ml. Como se

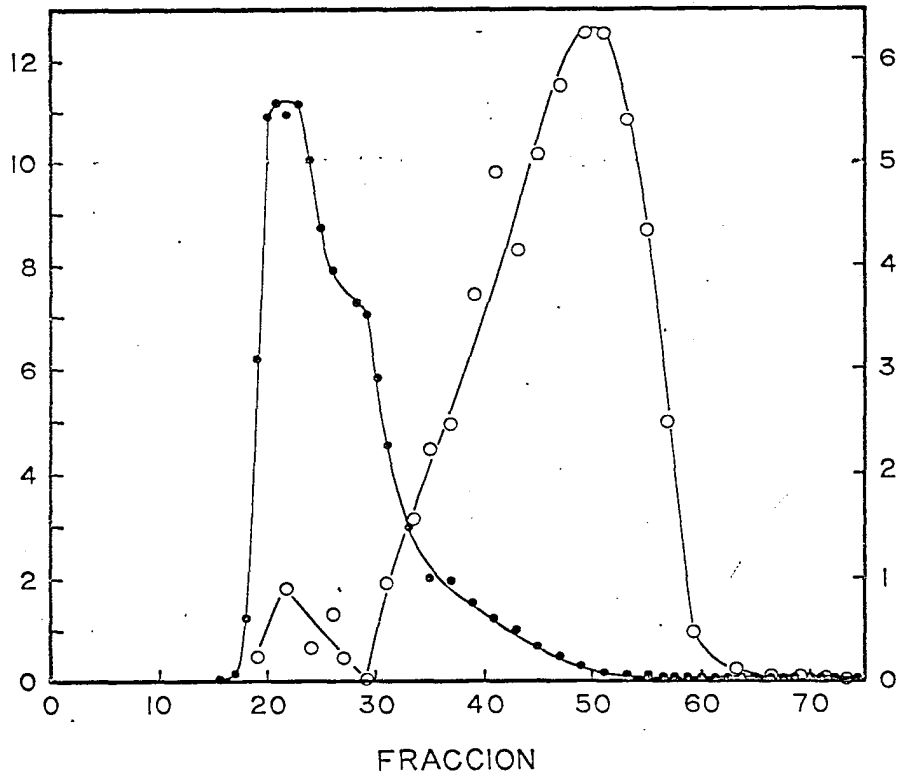
Figura 5

Purificación de la actividad inhibitoria de quitina sintetas por filtración en Sephadex G-100. El citosol crudo fue precipitado con sulfato de amonio a 45% de saturación; el precipitado se disolvió en amortiguador B y se dializó en el mismo amortiguador; se aplicó (11 ml; 143 mg de proteína) a una columna de Sephadex G-100 (99 x 1.9 cm) y se eluyó con amortiguador B. Se colectaron fracciones de 5 ml. Se midió la absorbancia a 280 nm (●) y la actividad inhibitoria se expresó en unidades (⊖). (Ver "Materiales y Métodos").

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE

QUITINA SINTETASA

(unidades $\times 10^{-3}$) (○—○)



A 280 (●—●)

muestra en la Figura 5 las fracciones que contengan al principal pico de actividad inhibitoria de quitina sintetasa (35-62) se juntaron y se concentraron con un equipo de ultrafiltración Amincon equipado con una membrana PM-10 bajo presión de N_2 hasta un volumen de 12 ml.

PASO IV. Cromatografía en Sephadex G-25. A las fracciones concentradas obtenidas en el paso de cromatografía anterior se les aplicó a una columna de Sephadex G-25 (fino) de 87×1.9 cm previamente equilibrada con amortiguador B. La elución se llevó a cabo con el mismo amortiguador y se colectaron fracciones de 5 ml. En la Figura 6 se muestra el patrón de elución de la actividad inhibitoria de quitina sintetasa en Sephadex G-25 (fino), se puede observar que la actividad inhibitoria se retiene en la columna y se eluye de ella con un volumen de amortiguador mayor que el volumen de exclusión de la columna. Las fracciones con actividad inhibitoria (62-110) se juntaron y se concentraron por ultrafiltración como se mencionó para el paso anterior, hasta un volumen de 5 ml. Las columnas de Sephadex separan a la actividad inhibitoria de la quitina sintetasa de la mayor parte de la proteína que se encuentra en la fracción concentrada con sulfato de amonio, posiblemente debido en parte a las propiedades del gel de separar por forma y peso, pero también por una interacción entre la molécula responsable de la actividad inhibitoria y la matriz del gel.

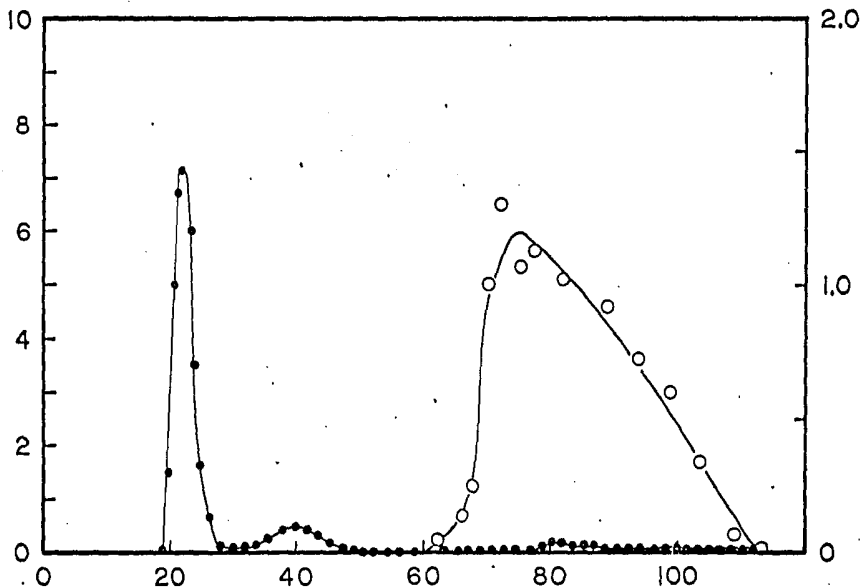
En la Figura 7 se muestra la curva de inhibición de la actividad de quitina sintetasa que se obtuvo al adicionar la fracción concentrada de la actividad inhibitoria que se obtuvo en la cromatografía en Sephadex G-25 (fino). De igual manera que en la curva de inhibición que se obtuvo con la fracción de citosol crudo, no se logró alcanzar el 100% de inhibición de la actividad de quitina sintetasa, saturándose el sistema

Figura 6

Purificación de la actividad inhibitoria por filtración en Sephadex G-25. La actividad inhibitoria separada por filtración en Sephadex G-100 (fracciones 35-62; figura 5) se concentraron (12 ml; 31.5 mg de proteína) y se aplicaron a una columna de Sephadex G-25 (fino) de 87×1.9 cm; se eluyó con amortiguador B. Se colectaron fracciones de 5 ml. Se midió la absorbancia de 280 nm (●) y la actividad inhibitoria se expresó en unidades (⊖). (Ver "Materiales y Métodos").

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE
QUITINA SINTETASA

(unidades $\times 10^{-3}$) (○—○)



A 280 (●—●)

FRACCION

Figura 7

Efecto de la actividad inhibitoria purificada sobre la quitina sintetasa. Se adicionaron cantidades crecientes de la actividad inhibitoria purificada obtenida mediante el procedimiento de purificación descrito y se midió la actividad de quitina sintetasa. (Ver "Materiales y Métodos").

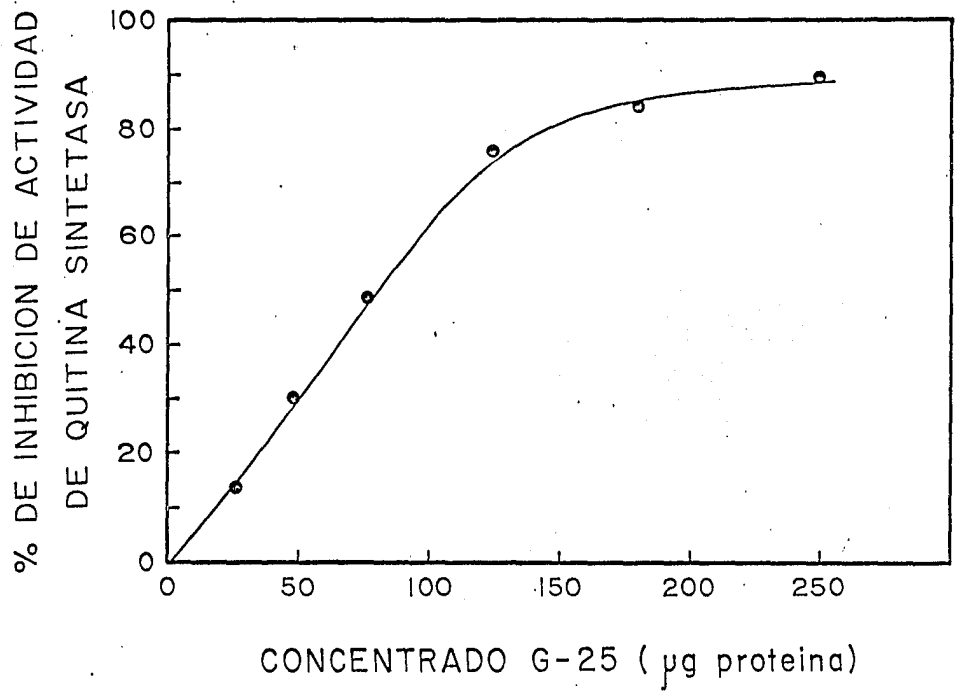


TABLA III

RESUMEN DE LA PURIFICACION DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE QUITINA SINTETASA DE *Neurospora crassa*

Paso No.	Fracción	Proteína total (mg)	Actividad total (unidades)	Actividad específica (unidades/mg)	Purificación (veces)	Recuperación %
1	Extracto crudo	586	131,859	225	1	100
2	Precipitado (NH ₄) ₂ SO ₄	143	58,500	410	1.8	44.3
3	Sephadex G-100 (pool)	31.5	46,666	1,481	6.6	35.3
4	Sephadex G-25 (pool)	0.9	10,885	12,094	53.7	8.2

La actividad inhibitoria fue medida empleando quitina naciente como sustrato, como se describe en "Materiales y Métodos".

Una unidad de actividad inhibitoria fue la cantidad que causó 1% de inhibición de la actividad de quitina sintetasa.

en un valor cercano al 80% de inhibición. La Tabla III muestra los resultados obtenidos durante la purificación parcial de la actividad inhibitoria de quitina sintetasa presente en el citosol. La recuperación obtenida fue de 8.2% y se logró purificar 54 veces a partir del citosol crudo. La actividad inhibitoria se expresó en unidades, una unidad de actividad inhibitoria fue la cantidad que causó 1% de inhibición de la actividad de quitina sintetasa.

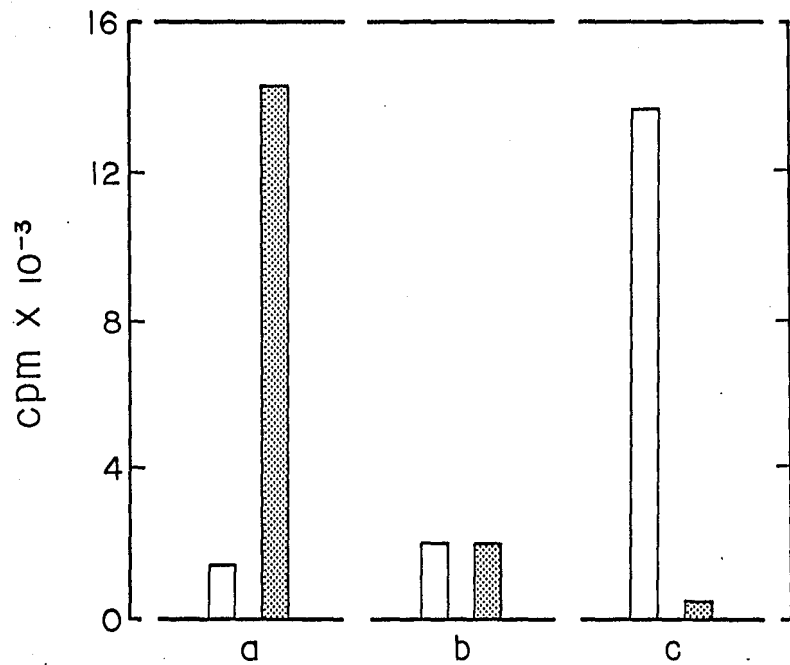
D. MECANISMO DE ACCION DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA QUITINA SINTETASA.

Con la finalidad de probar si la actividad del inhibidor de la quitina sintetasa purificado era en realidad la consecuencia de hidrolisis de la quitina que se producía por la acción de la quitina sintetasa, y no a un efecto inhibitorio directo sobre la proteína enzimática misma, se ensayó la presencia de actividad hidrolítica de quitina (quitinasa) en las preparaciones de inhibidor parcialmente purificado. Se utilizaron como substratos de la reacción tanto quitina previamente formada en un sistema estándar de síntesis de quitina (descrito en "Materiales y Métodos"), así como quitina formada en presencia del inhibidor parcialmente purificado (quitina naciente). Para lograr esto se mezcló la preparación de quitina sintetasa previamente activada por tripsina, mezcla de reacción de la quitina sintetasa (substrato para generar quitina naciente) y el inhibidor purificado.

La Figura 8 muestra el resultado del análisis cromatográfico en placa fina de DEAE-celulosa de los compuestos producidos por el sistema de ensayo que emplea quitina naciente como substrato. Alrededor de 87% de la quitina producida por el sistema de quitina naciente durante el tiempo de

Figura 8

Cromatografía en placa fina de DEAE-celulosa de los productos obtenidos por la acción de la preparación de inhibidor sobre la quitina naciente. El ensayo fue llevado a cabo agregando la preparación de inhibidor (20 μ l; 1.1 μ g de proteína) a una mezcla de reacción estándar de quitina sintética (barras abiertas). Los experimentos control se llevaron a cabo sin la adición de la preparación de inhibidor (barras punteadas). Después de 1 hora de incubación a 22°C, la totalidad de la mezcla de reacción fue desecada en una área pequeña cerca del extremo de una placa de DEAE-celulosa. Las placas se corrieron como se describe en "Materiales y Métodos". La radioactividad que permaneció en el origen después de cromatografía, primero con agua destilada, y después con NaCl 0.4 M más 0.2 M HCl, correspondió a la quitina sin degradar, (a); el material radioactivo que permaneció inmóvil después de la elución de la placa con agua destilada pero que se desplazó con el frente de la solución de NaCl 0.4 M más HCl 0.2 M, correspondió al UDP-GlcNAc, (b); el material radioactivo que migró con el frente del agua destilada correspondió a los oligosacáridos, (c).



incubación, resultó transformada en oligosacáridos de quitina. En un experimento control, en ausencia de la preparación de inhibidor, solo se encontró que 2-3% de la quitina formada por la quitina sintetasa presente en los quitosomas fue transformada en oligosacáridos. Esto sugiere que los quitosomas poseen una actividad de quitinasa muy baja. En esta misma figura se muestra que en presencia de la preparación de inhibidor no se modificó la cantidad remanente del sustrato (UDP-GlcNAc) que se utilizó para la síntesis de quitina por la enzima quitina sintetasa. En consecuencia, la actividad inhibitoria de la preparación parece depender de la destrucción de la quitina formada y no de la destrucción del UDP-GlcNAc. En vista de lo anterior se midió directamente la actividad de quitinasa de la preparación de inhibidor utilizando como sustrato quitina radioactiva, sintetizada como se describe en "Materiales y Métodos". La Figura 9 muestra los resultados de análisis cromatográfico en placas de DEAE-celulosa de este experimento. En él se puede ver que la quitina fue susceptible a la acción quitinolítica del inhibidor, siendo ésta convertida a oligosacáridos. El 20% fue degradada, en contraste con el 2% de degradación obtenido para el control en ausencia de la preparación de inhibidor.

Los resultados obtenidos del ensayo de actividad de quitinasa con quitina naciente o con quitina preformada como sustratos, llevan a establecer la conclusión de que la actividad aparentemente inhibitoria de la quitina sintetasa que se purificó, no correspondía realmente a una actividad inhibitoria sino más bien a una actividad quitinolítica.

En la Tabla IV se muestra que ambos tipos de sustrato fueron hidrolizados por la actividad de quitinasa presente en *N. crassa*, aunque la quitina naciente fue aparentemente más susceptible a la degradación

Figura 9

Cromatografía en placa fina de DEAE-celulosa de los productos obtenidos por la acción de la preparación de inhibidor sobre quitina. El ensayo fue llevado a cabo agregando la preparación de inhibidor (20 μ l; 1.1 μ g de proteína) a una mezcla de reacción estándar de quitina sintética, la cual había sintetizado quitina durante 1 hora y en la que se detuvo la reacción por adición de polioxina D (barras abiertas). Los experimentos control se llevaron a cabo sin la adición de la preparación de inhibidor (barras rayadas). Después de 1 hora de incubación a 22°C, la totalidad de la mezcla de reacción fue desecada en un área pequeña en un extremo de una placa de DEAE-celulosa. Las placas se corrieron como se describe en "Materiales y Métodos". La radioactividad que permaneció en el origen después de la cromatografía, primero con agua destilada, y después con NaCl 0.4 M más 0.2 M HCl correspondió a la quitina sin degradar, (a); el material que permaneció inmóvil después de la elución de la placa con agua destilada pero que se desplazó con el frente de la solución de NaCl 0.4 M más HCl 0.2 M correspondió al UDP-G1NAc, (b); el material radioactivo que migró con el frente del agua destilada correspondió a los oligosacáridos, (c).

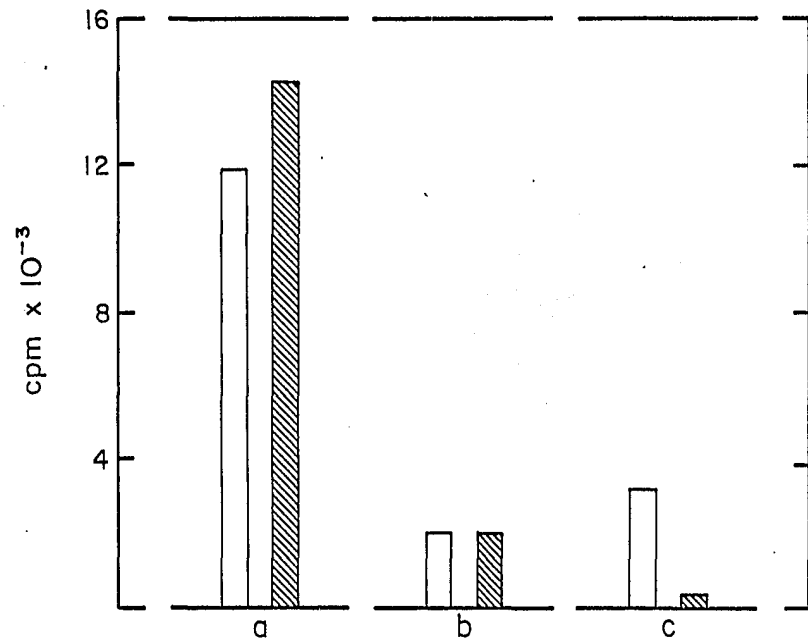


TABLA IV

EFFECTO DE LA ACTIVIDAD DE QUITINASA PRESENTE EN LAS PREPARACIONES DE INHIBIDOR DE *Neurospora crassa* SOBRE QUITINA NACIENTE O PREFORMADA

Adiciones	Radioactividad liberada por hidrólisis de quitina substrato (cpm)	
	Quitina Preformada	Quitina Naciente
Ninguna	513 (2.4%)*	684 (3.2%)*
Preparación de inhibidor	4,340 (20.6%)	18,436 (87.5%)
Quitinasa de <u>Streptomyces</u>	14,380 (63.5%)	20,884 (99.1%)

La radioactividad total incorporada en quitina preformada (21.060 cpm) corresponde a 47.5 nmoles GlcNAc; este valor fue tomado como control también para la quitina naciente.

- * Actividad quitinolítica endógena presente en la preparación de quitosomas de *N. crassa* empleada para la síntesis de la quitina.

quitinolítica que la quitina preformada (aproximadamente 4 veces); mientras que la quitinasa comercial obtenida de *Streptomyces griseus* usada como control sólo fue 1,5 veces más activa sobre la quitina naciente que con la quitina preformada.

E. ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS PRODUCTOS DE REACCION OBTENIDOS POR LA ACCION DE LA QUITINASA SOBRE QUITINA NACIENTE Y SOBRE QUITINA PREFORMADA.

En vista del hallazgo de actividad de quitinasa en las preparaciones de inhibidor, se procedió a caracterizar los oligosacáridos producidos por la reacción de la quitinasa, para ello se extrajeron con agua destilada los oligosacáridos de la zona de la placa de DEAE-celulosa donde migraron después de realizar el primer paso cromatográfico. La solución acuosa resultante contenía los oligosacáridos, se procedió a concentrarlos por medio de liofilización. La muestra concentrada se desecó cerca del extremo de una tira de papel cromatográfico para ser analizada por cromatografía descendente como se describe en "Materiales y Métodos". Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10, cuando el sustrato de la quitinasa fue quitina naciente, el principal producto formado en 60 min de incubación fue N-N'-diacetilquitobiosa (67%). También se detectó la presencia de quitotriosa y quitotetraosa. Los productos de la acción de la quitinasa se identificaron mediante el uso de estándares apropiados. La suma de la radioactividad presente en esta zona de la tira de papel cromatográfico (quitotriosa y quitotetraosa) fue de 32%.

En la Figura 11 se muestran los resultados del ensayo de la actividad de quitinasa en el que se usó como sustrato para la reacción quitina previamente formada. La mezcla de reacción se incubó durante 60 min a

Figura 10

Cromatografía en papel de los oligosacáridos liberados por acción de la quitinasa a partir de quitina naciente. La mezcla de reacción estándar para el ensayo de quitina sintética se agregó a la preparación de quitinasa (ensayo de quitina naciente), y se incubó durante 1 hora a 22°C. La reacción se detuvo calentando a 75°C por 5 min. Los oligosacáridos se desplazaron con el frente del solvente en el paso cromatográfico en placa fina de DEAE-celulosa donde se usó agua como solvente. Los oligosacáridos fueron eluidos de las placas de DEAE-celulosa, aplicados a tiras de papel cromatográfico e irrigados en cromatografía descendente como se describe en "Materiales y Métodos". La posición de los estándares quitotetraosa, quitotriosa, quitobiosa y GlcNAc se indica con una barra.

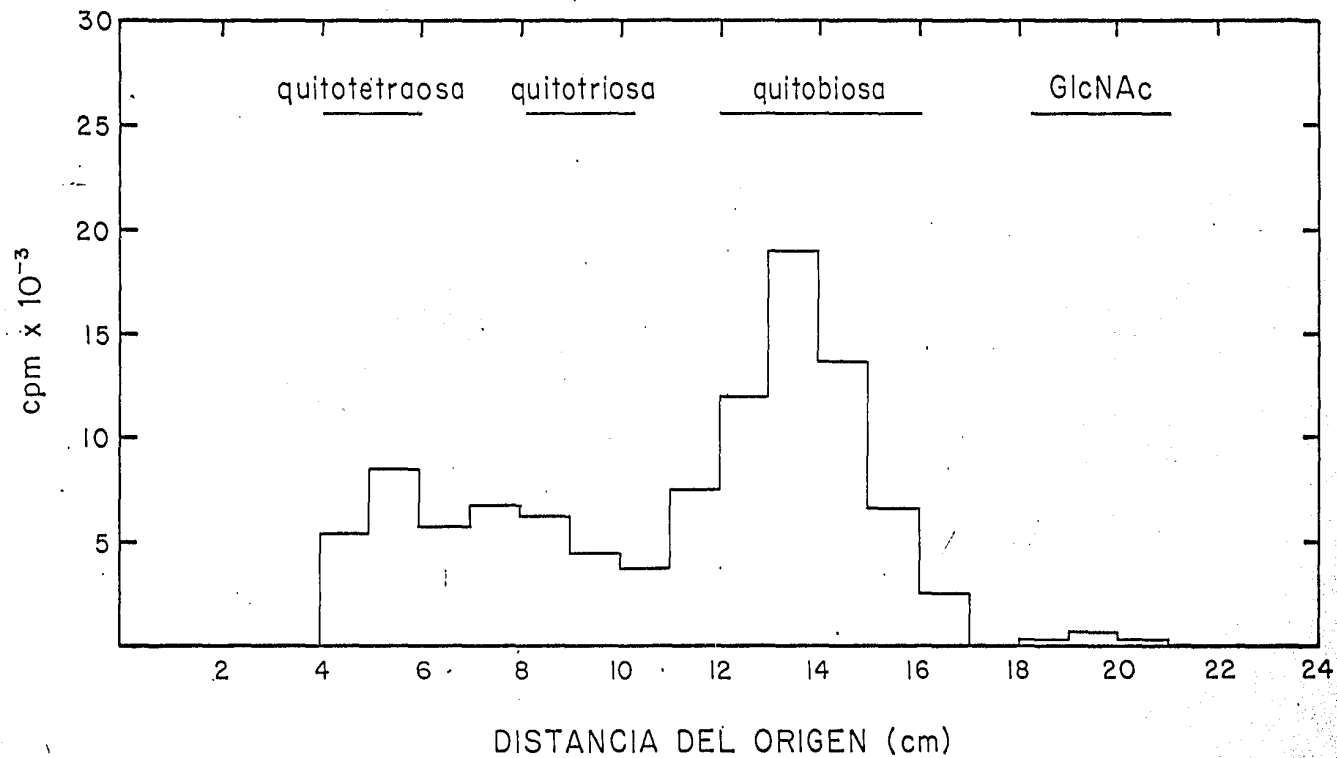
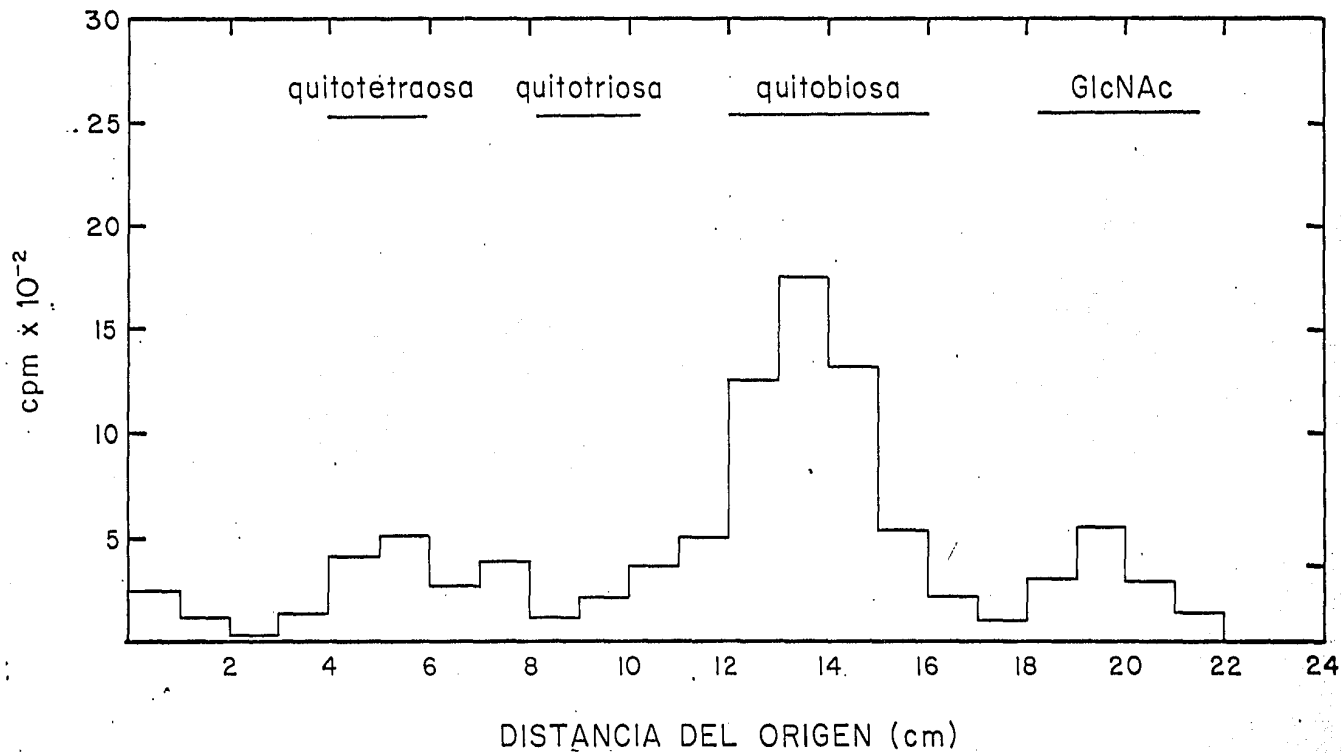


Figura 11

Cromatografía en papel de los oligosacáridos liberados por acción de la quitinasa a partir de quitina preformada. La mezcla de reacción estándar para quitina sintética fue incubada por 1 hora a 22°C, la reacción se detuvo agregando polioxina D a una concentración final de 100 μ M, se agregó la preparación de quitinasa (ensayo de quitina preformada) y la incubación se continuó por 1 hora a 22°C. La reacción se detuvo por calentamiento a 75°C por 3 min. Los oligosacáridos se desplazaron con el frente del solvente en la placa fina de DEAE-celulosa cuando se usó agua destilada para eluir la muestra. Los oligosacáridos fueron eluidos de las placas de DEAE-celulosa concentrados y aplicados a tiras de papel cromatográfico e irrigados en cromatografía descendente como se describe en "Materiales y Métodos".

La posición de los estándares quitotetraosa, quitotriosa, quitobiosa y GlcNAc se indican con una barra.



22°C, y se detuvo por calentamiento a 75°C durante 3 min. Los oligosacáridos de quitina producidos por el sistema de ensayo se separaron, extrajeron y concentraron de igual forma que para el ensayo de quitinasa con quitina naciente como sustrato. Se observó que el principal producto de la reacción de la quitinasa sobre la quitina preformada fue la N-N'-diacetilquitobiosa (54%). Se detectó también la producción de quitotriosa y quitotetraosa, la suma de ambos productos fue aproximadamente 30% de la radioactividad total liberada. Además, se detectó la presencia de N-acetil-D-glucosamina.

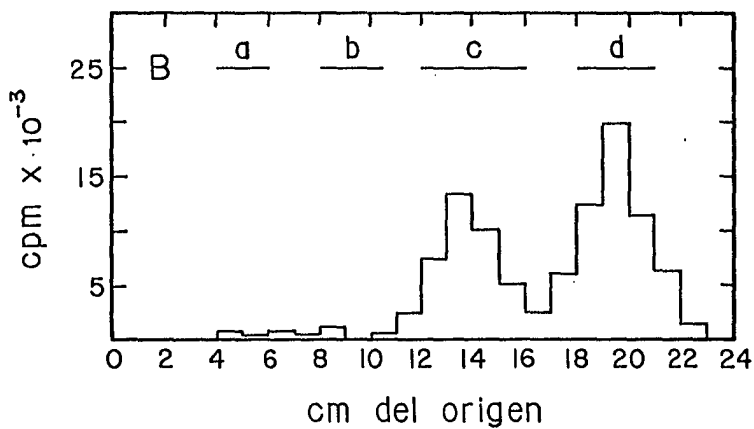
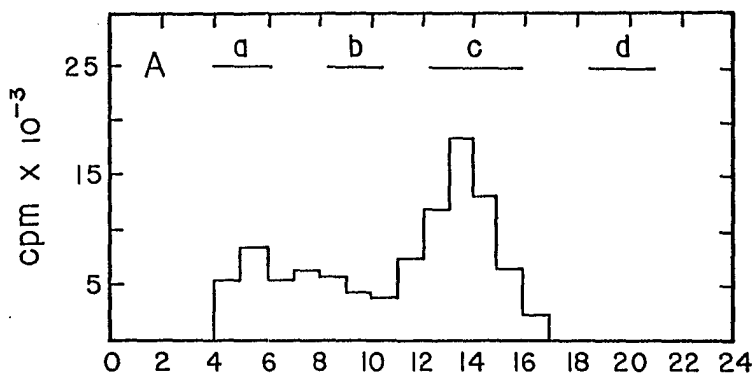
Los resultados mostrados en las Figuras 10 y 11 sugieren que la quitinasa presente en *N. crassa* tiene dos actividades: actividad de exo-quitinasa, ya que se produce N-N'-diacetilquitobiosa a partir de quitina naciente y quitina preformada, y actividad de endo-quitinasa ya que se producen quitotriosa y quitotetraosa por la acción de la enzima sobre los sustratos quitina naciente y quitina preformada. La aparición de N-acetil-D-glucosamina indica que posiblemente la preparación de inhibidor purificado posee además actividad de quitobiosa, la cual se hizo más aparente cuando se utilizó como sustrato para la quitinasa a la quitina preformada.

F. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE QUITINASA EMPLEANDO OLIGOSACÁRIDOS DE QUITINA COMO SUBSTRATO

Con el objeto de probar la susceptibilidad de los oligosacáridos de quitina a la acción de quitinasa, se aislaron los oligosacáridos de quitina radioactiva, y se les probó como sustrato de la actividad de quitinasa. La mezcla de oligosacáridos y quitinasa de *N. crassa* se incubó durante 3 horas a 22°C y los productos de reacción se analizaron

Figura 12

Cromatografía en papel de los productos liberados por acción de la quitinasa a partir de oligosacáridos de quitina. Los oligosacáridos producidos por el sistema de ensayo de quitina naciente fueron separados en placas de DEAE-celulosa, eluidos, concentrados y analizados por cromatografía en tiras de papel cromatográfico, (A); una muestra de los oligosacáridos obtenidos como se describe arriba fue tratada con la preparación de quitinasa de *N. crassa*. Se incubó por 3 horas a 22°C, la reacción se detuvo por calentamiento a 75°C por 3 min y se aplicó a tiras de papel cromatográfico, (B). En ambos casos las tiras de papel cromatográfico fueron irrigadas en cromatografía descendente, como se describe en "Materiales y Métodos". La identificación de los productos se hizo por medio de estándares apropiados, la posición de éstos se indica con barras; quitotetraosa, (a); quitotriosa (b); N-N'-diacetilquitobiosa, (c); N-acetil-D-glucosamina, (d)



por cromatografía descendente como se describe en "Materiales y Métodos". La Figura 12 muestra que tanto la quitotriosa como la quitotetraosa fueron degradados casi totalmente hasta N-N'-diacetilquitobiosa y N-acetil-D-glucosamina. Estos resultados indican que la quitinasa de *N. crassa* puede utilizar los oligosacáridos de quitina como sustrato.

G. DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE QUITINASA EN *N. crassa*

Con el objeto de investigar la localización de la actividad de quitinasa en *N. crassa*, se homogeneizó el micelio y fraccionó por medio de centrifugación diferencial. El homogenado se centrifugó a 1,000 g (rav) durante 5 min, el material que precipitó (fracción, paredes celulares; FPC) se lavó ocho veces con 10 volúmenes de amortiguador A y se resuspendió en un volumen final de 11 ml. El sobrenadante se centrifugó durante 30 min a 13,500 g (rav) y al precipitado (fracción, membranas pesadas; FMP) se le lavó dos veces con amortiguador A y se resuspendió en 4 ml del mismo amortiguador. El sobrenadante se centrifugó a 160,000 g (rav) durante 60 min y al precipitado (fracción, membranas ligeras; FML) se lavó dos veces y se resuspendió en 4 ml de amortiguador A. El sobrenadante resultante (fracción, citosol; FC) se le colectó (17 ml). La distribución de la actividad de quitinasa en las fracciones celulares obtenidas se muestra en la Tabla V. Se puede observar que la fracción citosol contenía 55% de la actividad total de quitinasa, la fracción de paredes celulares contenía 32.6% de la actividad total, mientras que el 12% restante se distribuyó entre las dos fracciones membranales.

TABLA V

DISTRIBUCION DE LA ACTIVIDAD DE LA QUITINASA EN FRACCIONES
SUBCELULARES DE *Neurospora crassa*

Fracción	Proteína		Actividad de la quitinasa		
	Total (mg)	%	Específica (unidades mg)	Total (unidades)	%
FPC	8.8	7.7	1.67	14.77	32.6
FMP	15.0	13.1	0.17	2.6	5.7
FML	18.0	15.9	0.16	3.0	6.7
FC	72.4	63.4	0.34	24.9	55.0

A las fracciones se les ensayó la actividad de quitinasa sobre quitina preformada, como se describe en "Materiales y Métodos", en presencia de polioxina D 100 μ M, a un pH final de 8.3. Las actividades totales se expresan en unidades. 1 Unidad de actividad de quitinasa es la cantidad de enzima que produce la formación de 1 μ mola de N-N'-diacetilquitobiosa por hora.

H. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD DE QUITINASA EN EL MEDIO DE CULTIVO

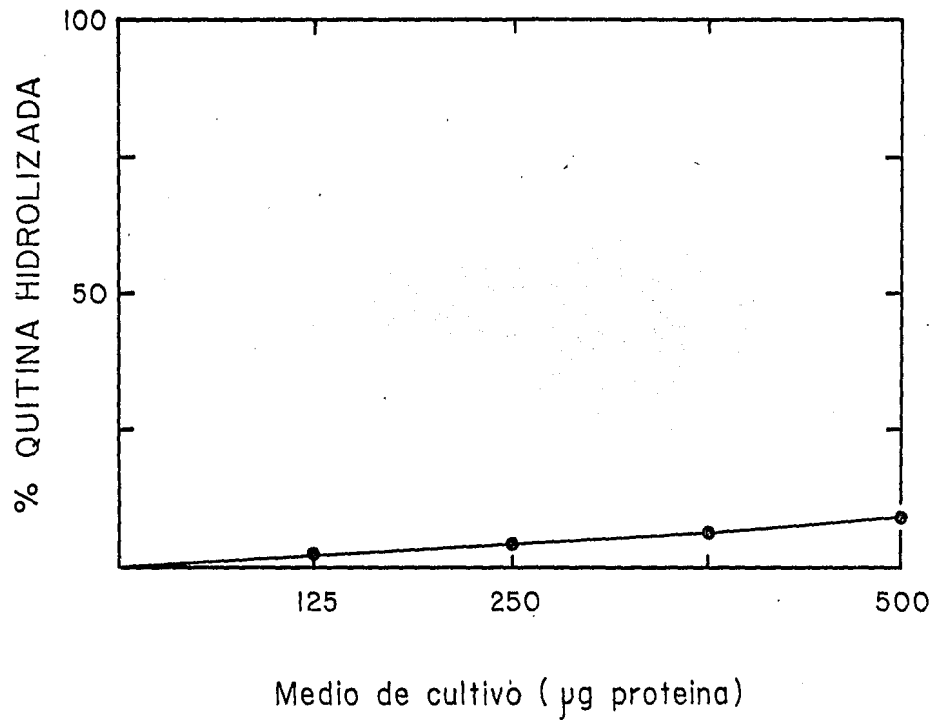
Con el objeto de investigar si la quitinasa de *N. crassa* es una enzima que se secreta al medio extracelular, se buscó la actividad de quitinasa en el medio de cultivo durante el crecimiento del organismo. El medio de crecimiento de un cultivo de 48 h de edad se le separó por centrifugación a 5,000 g (rav) durante 15 min. Se le concentró 10 veces por ultrafiltración a través de una membrana PM-10. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13. La cantidad de quitina convertida en oligosacáridos fue inferior al 10% con respecto al control, aun cuando se emplearon cantidades elevadas de medio de cultivo (100 μ l; 500 μ g de proteína). La actividad enzimática específica para la quitinasa encontrada en el medio de cultivo (1.58 μ moles de N-N'-diacetilquitobiosa/hora/mg de proteína) fue muy baja comparada con la actividad específica de la quitinasa que se localiza en el citosol del organismo (0.34 μ moles de N,N'-diacetilquitobiosa/hora/mg de proteína). Estos resultados sugieren que la quitinasa de *N. crassa* no tiene una función extracelular en el medio de cultivo.

I. ESTABILIDAD A LA TEMPERATURA

La actividad de quitinasa parcialmente purificada mostró ser muy estable cuando se mantuvo a 0°C en baño de hielo. En estas condiciones se recuperó el 80% de la actividad después de 8 días de incubación. Sin embargo, cuando se incubó a 92°C durante 1 hora se observó una pérdida de actividad superior al 75%.

Figura 13

Efecto de la adición del medio de cultivo sobre la actividad de quitina sintetasa. Al medio de cultivo en el que creció el micelio de *Neurospora crassa* durante 48 horas se le separó por filtración y se le concentró 10 veces. El medio concentrado se agregó a mezclas de reacción estándar para el ensayo de quitina sintetasa, se incubaron 3 horas a 22°C, entonces se detuvo la reacción a 75°C por 3 min. Se midieron los oligosacáridos que se movieron con el frente del paso cromatográfico en placas de DEAE-celulosa donde se usó agua destilada como solvente. Se calculó el % de radioactividad liberada como oligosacáridos a partir de quitina.



J. DIGESTION PROTEOLITICA

Se incubó la preparación de quitinasa obtenida del paso cromatográfico en Sephadex G-100 en presencia de tripsina a una concentración final de 800 µg/ml a 25°C en amortiguador A, a pH de 7.5. Se tomaron muestras alícuotas de 100 µl cada 30 min y se les agregó inhibidor de tripsina (de frijol de soya) en una relación estequiométrica con la tripsina de 1:1 (p/p); se ensayó la actividad de quitinasa en las muestras utilizando a la quitina preformada como sustrato de la reacción. El tiempo de incubación fue de 60 min, el pH de 7.0 y la temperatura de 25°C. Después de 120 min de incubación con tripsina, la actividad quitinasa se destruyó por completo. Este experimento indica que la molécula responsable de la actividad quitinolítica es de naturaleza proteica.

K. DETERMINACION DE PH OPTIMO

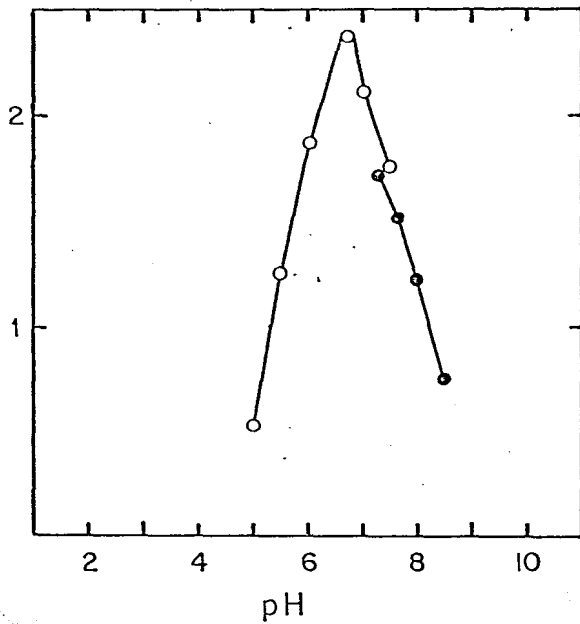
Para los ensayos de pH óptimo se incubó a la preparación de quitinasa en presencia de amortiguadores de diferentes valores de pH, utilizando quitina preformada como sustrato. En la Figura 14, se observa que el pH óptimo para la quitinasa de *N. crassa* fue de 6.6 (100%), a valores de pH de 5.0 y de 8.6 se obtuvieron valores de 23% y 31.5% de la actividad máxima, respectivamente.

El ensayo de pH óptimo usando quitina naciente como sustrato para la quitinasa no fue factible de realizar, debido a que la enzima quitina sintetasa es muy inestable a valores de pH por abajo de 7.0 (Arroyo-Begovich y Ruíz-Herrera, 1979).

Figura 14

Perfil de actividad de la quitinasa de *N. crassa* a diferentes valores de pH. Para la síntesis de quitina substrato las mezclas de reacción estándar para quitina sintética fueron incubadas por 1 hora a 22°C. La reacción se detuvo agregando polioxina D a una concentración final de 100 µM, después se agregó la preparación de quitinasa. Los valores de pH empleados se obtuvieron añadiendo TRIS-base 50 mM (pH 7.2-9.0; ●), o bien KH₂PO₄ 50 mM (pH 5.0-7.5; ⊖). Las mezclas se incubaron durante 1 hora a 22°C. La cantidad de oligosacáridos liberados se midió como se describe en "Materiales y Métodos".

Radioactividad liberada a partir
de quitina ($\text{cpm} \times 10^{-3}$)



L. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR DE LA QUITINASA DE *N. crassa*

La estimación del peso molecular de la quitinasa parcialmente purificada a partir del citosol de *Neurospora crassa* se realizó por cromatografía analítica en gel, para ello se utilizó una columna de flujo hacia arriba que contenía Ultrogel Aca-54. Las dimensiones de la columna y condiciones de elución se describen en "Materiales y Métodos". El procedimiento de calibración de la columna que se eligió fue el descrito por Ackers (1964) el cual establece una interrelación lineal entre el radio molecular y el peso molecular. La posición de elución de una sustancia puede ser caracterizada por su valor de K_{av} :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

donde V_e es el volumen de elución del pico máximo de concentración del soluto a investigar, V_o es el volumen excluido de la columna (volumen de elución de una sustancia que no penetra en el espacio de solvente dentro de las partículas del gel, p.e., la molécula de Dextrano azul 2000); V_t es el volumen total del gel, que para esta columna de Ultrogel Aca-54 fue $V_t = 356$ ml. La Figura 15 muestra el perfil de elución del Dextrano azul 2000, el cual eluyó de la columna en un volumen ($V_o = 107$ ml) que correspondió al volumen excluido de la columna. El registro continuo a 280 nm detectó un pico homogéneo único de proteína, cuyo punto máximo fue $V_e = 245$ ml. A partir de estos valores se calculó el valor de $K_{av} \pm 0.5542$. La actividad inhibitoria de quitina sintetasa (quitinasa) en la preparación parcialmente purificada eluyó de la columna analítica en un pico único. La Figura 16 relaciona el volumen de elución del pico máximo obtenido para los estándares Hemoglobina (Hb), Albúmina sérica bovina (Alb), Tripsina (Trip), Citocromo c (Cit c) con el \log_{10} de su peso molecular expresado en daltones.

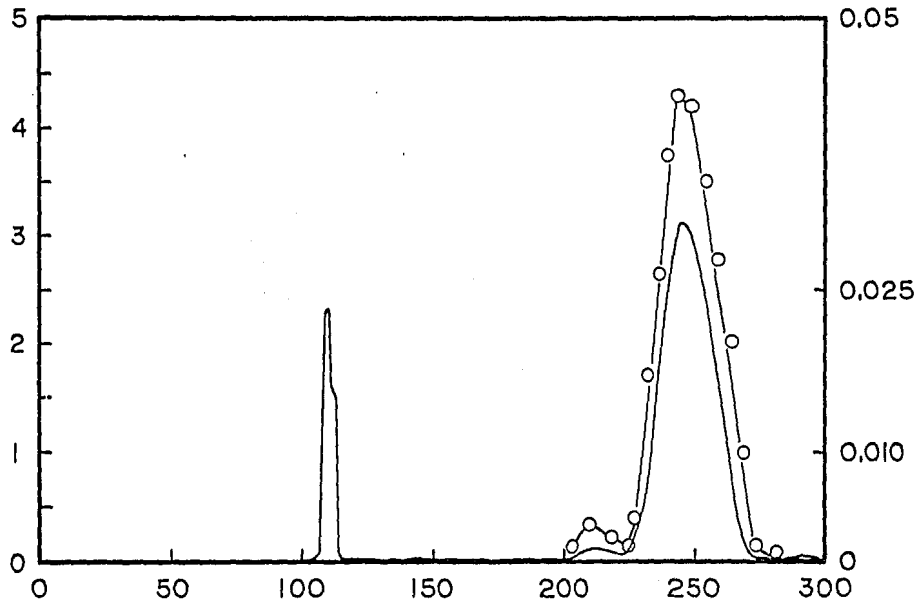
Al interpolar el valor del volumen de elución del pico máximo de la actividad de quitinasa se encontró el valor de 20,600 daltones para esta enzima.

Figura 15

Cromatografía analítica en Ultrogel AcA-54 de la quitinasa purificada. La preparación de inhibidor que se obtuvo del paso de purificación en Sephadex G-25 se aplicó (5 ml: 0.9 mg de proteína) a una columna (140 × 1.8 cm) de Ultrogel AcA-54. La columna se eluyó con flujo hacia arriba con el amortiguador de sulfato de amonio 50 mM, pH 7.0. Se colectaron fracciones de 5 ml. Se registró continuamente (—) a 280 nm, y se midió la actividad inhibitoria (⊖), la cual refleja directamente la actividad de quitinasa.

ACTIVIDAD INHIBITORIA DE
QUITINA SINTETASA

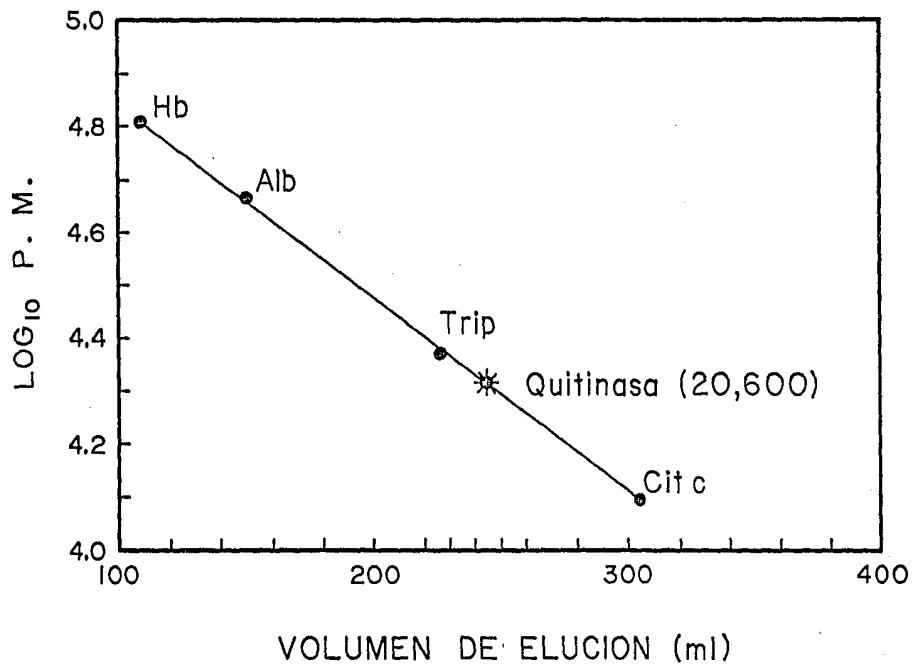
(unidades $\times 10^{-3}$) (○—○)



VOLUMEN DE ELUCION (ml)

Figura 16

Determinación del peso molecular de la quitinasa parcialmente purificada de *N. crassa*. Se midió el volumen de elución de los picos máximos de los estándares y se graficó vs. el \log_{10} de su peso molecular (daltones). Se interpoló el volumen de elución del pico máximo de la proteína purificada.



IV, DISCUSION

Debido a que la quitina es considerada el polisacárido más importante que sirve de esqueleto a la pared celular de diversos grupos de hongos, el proceso de biosíntesis de la quitina y su regulación han recibido considerable atención en los últimos 15 años.

En varios de los hongos que tienen quitina en su pared se ha estudiado la actividad de quitina sintetasa y se ha encontrado en la mayoría de ellos, que esta enzima es susceptible a la activación proteolítica; por tanto, se ha llegado a postular que la quitina sintetasa es sintetizada en forma inactiva como zimógeno por la célula (Arnold, 1972, Balint y col., 1976).

En *Neurospora crassa* se ha encontrado que los extractos celulares contienen a la quitina sintetasa predominantemente en forma inactiva o zimogénica. Esta enzima es activada por la acción de proteasas; de las proteasas estudiadas la tripsina es la más eficaz, habiéndose logrado un incremento de la actividad de esta enzima en más de 10 veces (Arroyo-Begovich y Ruíz-Herrera, 1979). Cabib y col. (1973,1976) han propuesto un modelo hipotético para el mecanismo de regulación de la actividad de la quitina sintetasa. En este modelo, la quitina sintetasa zimogénica se activa por proteólisis mediante un factor al que se ha llamado Factor Activante, y al cual se ha identificado como la Proteínasa B. Este factor puede ser bloqueado por un inhibidor proteico específico.

Por otra parte, los estudios de López-Romero y col. (1978), indican que en los extractos celulares de *Mucor rouxi* existe una proteína capaz de inhibir la actividad de la quitina sintetasa previamente activada, sin interferir con el proceso de activación proteolítica de la enzima.

En consecuencia, se han postulado dos posibles mecanismos de regulación de la quitina sintetasa; uno es la inhibición del proceso de conversión de la quitina sintetasa a partir de su forma inactiva o zimogénica a la forma activa por un inhibidor de la proteasa activante; y el otro consiste en la inhibición directa de la actividad de quitina sintetasa en su forma activada, por medio de un inhibidor de naturaleza proteica.

En vista del papel morfogenético crucial que juega la quitina en la pared celular de los hongos, la interconversión entre las dos formas de la quitina sintetasa, posiblemente represente un mecanismo clave para la regulación de la síntesis de quitina y por consecuencia de la morfogénesis de la pared celular.

Otros mecanismos pueden estar involucrados en la regulación de la actividad de la quitina sintetasa. Entre estos mecanismos se podrían citar aquellos que modifican directamente a la proteína enzimática, como por ejemplo, fosforilación-defosforilación, transferencia de grupo, etc., o bien, modificaciones alostéricas de la enzima por nucleótidos cíclicos, los sustratos y los productos de la enzima.

Los resultados que se reportan en este trabajo, indican que en la fracción soluble del citosol obtenido de extractos celulares de *N. crassa* existe una actividad inhibitoria de la quitina sintetasa en su forma activada. Al investigar el mecanismo de esta inhibición, se encontró que ésta era reversible, por lo que se eliminó la posibilidad de que la inhibición observada fuera debida a destrucción proteolítica de la enzima. Además, se encontró que esta actividad inhibitoria no interfería con la activación proteolítica de la enzima. Estos resultados han permitido proponer que el mecanismo de la inhibición de la síntesis de quitina por la adición del citosol de *N. crassa* podría deberse a una interacción

directa del inhibidor sobre la quitina sintetasa,

El análisis de la cinética de inhibición de la actividad de esta enzima por la fracción del citosol, mostró que el efecto inhibitorio fue proporcional a la cantidad de citosol empleado, cuando éste se adicionó a bajas concentraciones. Sin embargo, aun empleando altas concentraciones de citosol no se logró una inhibición mayor al 85%. Con la intención de caracterizar de manera más profunda esta actividad inhibitoria, el citosol se sometió a varios pasos de purificación: primero se le fraccionó con sulfato de amonio y posteriormente se sometió a filtración en gel a través de columnas de Sephadex G-100 y G-25. La actividad inhibitoria parcialmente purificada fue de nuevo examinada respecto a su cinética de inhibición sobre la quitina sintetasa activada. Se repitió la observación de que aun empleando altas concentraciones del inhibidor purificado no fue posible inhibir el 100% de la actividad de la quitina sintetasa. Se consideraron dos alternativas para explicar este fenómeno. Una de ellas pudiera ser que la preparación de quitosomas utilizada para los ensayos estuviera constituida por dos poblaciones: una susceptible a la inhibición y otra que no lo fuera. La otra alternativa consiste en que la inhibición de la actividad de la quitina sintetasa observada pudiera ser el resultado de la hidrólisis de la quitina producida a causa de actividad quitinolítica del inhibidor. Para determinar si existía hidrólisis de la quitina formada en el sistema de ensayo, se determinó la actividad de quitinasa en las preparaciones que contenían "actividad inhibitoria", cuantificando la liberación de oligosacáridos de quitina.

Los resultados obtenidos de los ensayos de actividad de quitinasa en las preparaciones de inhibidor, indican que la actividad aparentemente inhibitoria de quitina sintetasa de *N. crassa* fue debida en realidad a

una actividad de quitinasa presente en el citosol. La evidencia directa que apoya esta conclusión se deriva de los ensayos empleando como sustrato quitina naciente, en donde la cantidad de UDP-GlcNAc utilizada no resultó modificada por la adición de la preparación de inhibidor; en cambio, la quitina formada en el sistema fue hidrolizada por la actividad de quitinasa presente en las preparaciones de inhibidor, lo cual puso de manifiesto por la aparición de N-N'-diacetilquitobiosa y otros oligosacáridos de quitina.

Como se mencionó anteriormente, la adición de cantidades crecientes de inhibidor, ya fuera el citosol crudo o el inhibidor purificado no lograron inhibir 100% la actividad de quitinasa sintética. Esta observación podría explicarse porque la acción de la quitinasa responsable del aparente efecto inhibitorio no logró hidrolizar inmediatamente la quitina sintetizada por los quitosomas, haciéndose posible que los polímeros de quitina sintetizados pudieran cristalizar entre sí para formar microfibrillas. Las microfibrillas así formadas, son mucho más resistentes a la hidrólisis por la quitinasa, por ofrecer un mayor impedimento estérico a la acción de esta enzima. En los ensayos de actividad de quitinasa en los que se utilizó como sustrato quitina previamente formada se encontró que ésta es menos susceptible a la acción de la quitinasa en comparación con la susceptibilidad a la hidrólisis de la quitina naciente. En el caso de la quitina preformada se encontró que en el mismo período de incubación, que generalmente fue de una hora, aparecieron aproximadamente cuatro veces menos cantidad de oligosacáridos que en el caso de quitina naciente. La diferencia de la cantidad de oligosacáridos producidos cuando se utilizaron como sustratos de la quitinasa a la quitina naciente o a la preformada, está de acuerdo con que la quitina

preformada es menos susceptible a la hidrólisis por esta enzima, por haber cristalizado y haber formado puentes de hidrógeno intercatenarios, los cuales son característicos de las microfibrillas de este polisacárido. Esta posibilidad ha sido reportada anteriormente para el mecanismo de accesibilidad al sustrato por la quitinasa de *Streptomyces* y para la quitinasa de Germen de Trigo, estudiadas por Molano y col. (1977,1979).

El análisis de los productos de dregración de la quitina que se obtuvieron por adición de la quitinasa purificada de *N. crassa*, indica que el principal producto obtenido fue N-N'-diacetilquitobiosa; aunque además se obtuvieron otros oligosacáridos de mayor tamaño, como la quitotriosa y la quitotetraosa principalmente. Esto sugiere que la actividad de quitinasa presente en esta preparación exhibe tanto actividad de exoquitinasa (por la aparición de N-N'-diacetilquitobiosa) como de endoquitinasa (por la aparición de oligosacáridos de mayor tamaño). Con respecto a la afinidad de esta quitinasa por los oligosacáridos de tres y cuatro unidades de GlcNAc se encontró que éstos fueron susceptibles a hidrólisis por la preparación de quitinasa, produciéndose N-N'-diacetilquitobiosa y GlcNAc. Hallazgos recientes de López-Romero y col. (comunicación personal) indican que el inhibidor de quitina sintetasa de la forma de levadura de *M. rouxii* presenta actividad quitinolítica. Este resultado descarta por el momento que exista una inhibición real de la actividad de quitina sintetasa en ese hongo.

La distribución de la actividad de quitinasa en el micelio de *N. crassa* indica que aunque se detectó cierta cantidad de actividad en las membranas celulares (10%), la mayor parte de dicha actividad se encontró localizada en la fracción soluble del citosol (55%) o asociada a la pared celular del organismo (30%). El hecho de que la quitinasa que

se encontró asociada a las paredes celulares tuviera una actividad específica cinco veces mayor que la encontrada en el citosol, se explica por el hecho de que la pared celular posee poca proteína. Es probable, que en gran parte, la quitinasa que se detectó en la pared celular sea el resultado de la unión específica por afinidad de esta enzima a la quitina de la pared. Dicha unión podría haberse llevado a cabo durante el proceso de homogeneización del organismo. Sin embargo, existe la posibilidad de que in vivo la quitinasa se encuentre localizada en el espacio periplásmico, es decir, entre la membrana plasmática y la pared celular; esta última posibilidad tiene implicaciones fisiológicas. Un posible papel fisiológico de la quitinasa es el de participar en el fenómeno de recambio de la pared celular. Otro posible mecanismo fisiológico de la quitinasa sería su participación en el "ablandamiento" de la pared celular, en acción concertada con otras hidrolasas de los polisacáridos de la pared, como por ejemplo con las beta-glucanasas, en un paso previo a la síntesis de nuevos polisacáridos. En apoyo a los posibles papeles fisiológicos de la quitinasa se encuentra el hecho de que se hayan detectado cantidades mínimas en el medio de cultivo donde se creció *N. crassa*. Esto sugiere que su principal papel no es el de hidrolizar quitina extracelular para proveer de fuente de carbono al organismo.

Ha sido propuesta por varios autores la hipótesis referente a que la hifa de los hongos crece por extensión de su punta (Bartnicki-García, 1973; Robertson, 1965; Trinci, 1978). Ellos han propuesto que este crecimiento se logra por medio de la formación de nueva pared celular, precisamente en la punta de la hifa. Los datos experimentales que apoyan esta hipótesis de formación de la pared celular en los hongos, provienen de estudios basados en técnica de microscopía electrónica, autorradiografía, marcaje fluorescente, etc.

Suponiendo que en principio los mecanismos moleculares involucrados en los procesos de formación de la pared celular de los diferentes hongos sean los mismos o muy similares, el problema básico radica en saber cómo se regulan estos procesos de tal forma que se pueda generar una morfología característica para cada hongo. Varios autores han postulado hipótesis para explicar el posible mecanismo para la formación de la pared celular y la morfogénesis en los hongos. Al respecto, Johnson(1968) ha sugerido que la pared celular se elabora con la participación tanto de procesos líticos como sintéticos. De acuerdo con esta hipótesis, la estructura rígida de la pared celular pre-existente resulta atacada por enzimas hidrolíticas para los polisacáridos de la pared, los que generan de esta manera un mayor número de extremos reductores en los polisacáridos presentes en la zona de la pared donde éstas actuaron; como resultado de la generación de mayor número de extremos reductores, se hace posible que los polisacáridos de pared recién sintetizados puedan unirse a estos extremos reductores. La repetición continua de este proceso garantiza el crecimiento de la pared celular sin alterar la integridad global de ésta.

Ha sido demostrado por varios laboratorios que existe un balance muy delicado entre los procesos líticos y sintéticos de la pared celular de los hongos (Bartnicki-García y Lippman, 1972a). Se ha observado que cuando este balance se altera ocurren aberraciones morfológicas en el hongo e incluso, la lisis de la pared celular en éstos. Por ejemplo, la inhibición de la síntesis de quitina por la polioxina D es causa de la lisis de la pared de las células de hifa de *M. rouxi* (Bartnicki-García y Lippman, 1972b). También se ha observado que la inhibición de la síntesis de quitina, o bien la estimulación de la actividad de las enzimas

hidrolíticas de la pared mediante el aumento de la temperatura del medio en el cual crece la hifa de *A. nidulans* es causa de la aparición de distorsiones en el hongo y en algunos casos lisis en la pared celular de éste (Katz y Rosenberger, 1971 a,b). Los efectos que resultan de la inhibición de la síntesis de quitina por la plioxina D en los hongos, son en consecuencia de tipo morfogenético, y por lo tanto, recuerdan a la acción de la penicilina, el antibiótico que interfiere con la formación de la pared celular en algunas bacterias.

Se ha propuesto un modelo para la formación de la región primaria de crecimiento en la pared celular pre-existente en los hongos (Farkas, 1979). En este modelo se propone que el primer paso es la disolución localizada de la pared celular mediante enzimas hidrolíticas específicas para los polisacáridos presentes; esta disolución de la pared causa una pérdida de contacto entre la pared celular y la membrana plasmática del hongo. Se ha propuesto que la pérdida de contacto entre la pared y la membrana sea ese mecanismo que dispare la activación localizada de las enzimas sintética para los polisacáridos de la pared. El modelo mencionado indica cómo una secuencia de eventos puede crear una región de crecimiento activo en la pared celular de los hongos.

Los mecanismos regulatorios que se han revisado en los párrafos anteriores, representan intentos para explicar el desarrollo morfológico de los hongos en términos de sus interacciones moleculares. Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos que intervienen en el problema de la morfogénesis de los hongos es bastante complejo, y en muchos aspectos carece de suficiente apoyo experimental. De todas formas debe tenerse presente que la formación de la pared celular no es un proceso aislado, y que más bien, es el resultado de la actividad metabólica de toda la célula.

BIBLIOGRAFIA

- Ackers, G.K. (1964). Molecular exclusion and restricted diffusion processes in molecular-sieve chromatography. Biochemistry 3, 723-730.
- Archer, D.B. (1977). Chitin biosynthesis in protoplasts and subcellular fractions of *Aspergillus fumigatus*. Biochemical Journal 164, 653-658.
- Arnold, W.N. (1972). The structure of the yeast cell wall. Solubilization of a marker enzyme beta-fructofuranosidase by the autolytic enzyme system. J. Biol. Chem. 247, 1161-1169.
- Aronson, J.M. (1965). The cell wall, pp. 49-76. En: G.C. Ainsworth y A.D. Sussman (Ed.), *The fungi*, vol. 1, Academic Press Inc., New York and London.
- Arroyo-Begovich, A. y Ruiz-Herrera, J. (1979). Proteolytic activation and inactivation of chitin synthase from *Neurospora crassa*. J. Gen. Microbiol. 113, 339-345.
- Austin, P.R., Brine, C.J., Castle, J.E., & Zikakis, J.P. (1981). Chitin: New facets of research. Science 212, 7490755.
- Balint, S., V. Farkas & S. Bauer (1976). Biosynthesis of beta-glucans catalyzed by a particulate enzyme preparation from yeast. FEBS Lett. 64, 44-47.
- Ballou, C.E. (1976). Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell envelope. Adv. Microb. Physiol. 14, 93-158.
- Ballou, C.E. & Raschke, W.C. (1974). Polymorphism of the somatic antigen of yeast. Science 184, 127-134.
- Bartnicki-García, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Ann. Rev. Microbiol. 22, 87-108.

- Bartnicki-García, S. (1970). Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. pp. 81-103. En: J.B. Hasborne (Ed.) Phytochemical phylogeny. Academic Press Inc., New York and London.
- Bartnicki-García, S. & McMurrugh, I. (1971). Biochemistry of morphogenesis in yeasts, pp. 441-492. En: A.H. Rose, J.S. Harrison (Ed.), The Yeasts, Vol. 2: cap. 11. New York, Academic.
- Bartnicki-García, S. & Lippman, E. (1972a). 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.
- Bartnicki-García, S. & Lippman, E. (1972b). Inhibition of *Mucor rouxii* by polyoxin D: Effects on chitin synthase and morphological development. J. Gen. Microbiol. 71, 301-309.
- Bartnicki-García, S. (1973). Fundamental aspects of hyphal morphogenesis. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 23, 245-267.
- Bartnicki-García, S., Bracker, C.E., Reyes, E. & Rufz-Herrera, J. (1978). Isolation of chitosomes from taxonomically diverse fungi and synthesis of chitin microfibrils in vitro. Exp. Mycol. 2, 175-192.
- Bracker, C.E., Rufz-Herrera, J. & Bartnicki-García, S. (1976). Structure and transformation of chitin synthase particles (chitosomes) during microfibril synthesis in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4570-4574.
- Cabib, E. & Farkas, V. (1971). The control of morphogenesis: an enzymatic mechanism for the initiation of septum formation in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 2052-2056.
- Cabib, E., Farkas, V., Ulane, R.E. & Bowers, B. (1973). Yeast septum formation as a model system for morphogenesis, pp. 105-116. En: J.R. Villanueva, I. García-Acha, S. Gascón y F. Uruburu (Ed.). Yeast mold

and plant protoplasts. Academic Press Inc., New York and London.

- Cabib, E. (1975). Molecular aspects of yeast morphogenesis. Ann. Rev. Microbiol. 29, 191-214.
- Cabib, E. (1976). The yeast primary septum: a journey into the tree-dimensional biochemistry. Trends Biochem. Sci. 1, 275-277.
- Cardemil, L. & Pincheira, G. (1979). Characterization of the carbohydrate component of fraction I in the *Neurospora crassa* cell wall. J. Bacteriol. 90, 1075-1081.
- Cassone, A. (1973). Improved visualization of wall ultrastructure in *Saccharomyces cerevisiae*. Experientia 29, 1303-1305.
- Durán, A. & Cabib, E. (1978). Solubilization and partial purification of yeast chitin synthase. Confirmation of the zymogenic nature of the enzyme. J. Biol. Chem. 253, 4419-4425.
- Elbein, A.D. (1979). The role of lipid-linked saccharides in the biosynthesis of complex carbohydrates. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 239-272.
- Endo, A., Kakiki, K. & Misato, T. (1970). Mechanism of action of the antifungal agent polyoxin D. J. Bacteriol. 104, 189-196.
- Farkas, V. (1979). Biosynthesis of cell walls of fungi. Microbiol. Rev. 43, 117-144.
- Gander, J.E. (1974). Fungal cell wall glycoproteins and peptido-poly-saccharides. Ann. Rev. Microbiol. 28, 103-119.
- Glaser, L. & Brown, D.H. (1957). The synthesis of chitin in cell free extracts of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem. 228, 729-742.

- Gooday, G.W. (1977). Biosynthesis of fungal wall mechanisms and implications. J. Gen. Microbiol. 99, 1-11.
- Hemming, F.W. (1978). Polyprenol phosphate as coenzymes in protein and oligosaccharide glycosylation. Phil. Trans. Roy. Soc. London B, 284, 559-568.
- Hori, M., Kakiki, K. & Misato, T. (1974). Interaction between polyoxin and active center of chitin synthase. Agric. Biol. Chem. 38, 699-705.
- Hunsley, D. & Burnett, J.H. (1970). The ultrastructural architecture of the walls of some hyphal fungi. J. Gen. Microbiol. 62, 203-218.
- Hunsley, D. & Kay, D. (1976). Wall structure of *Neurospora crassa* hyphal apex-immunofluorescent localization of wall surface antigens. J. Gen. Microbiol. 95, 233-248.
- Issac, S., Ryder, N.S. & Peberdy, J.F. (1978). Distribution and activation of chitin synthase in protoplast fractions released during the lytic digestion of *Aspergillus nidulans* hyphae. J. Gen. Microbiol. 105, 45-50.
- Johnson, B.F. (1968). Lysis of yeast cell walls induced by 2-deoxy-glucose at sites of glucan synthesis. J. Bacteriol. 95, 1169-1172.
- Kats, D. & Rosenberger, R.F. (1971a). Hyphal wall synthesis in *Aspergillus nidulans*: effect of protein synthesis inhibition and osmotic shock on chitin insertion and morphogenesis. J. Bacteriol. 108, 184-190.
- Kats, D. & Rosenberger, R.F. (1971b). Lysis of an *Aspergillus nidulans* mutant blocked in chitin synthesis and its relation to wall assembly and wall metabolism. Arch. Microbiol. 80, 284-292.
- López-Romero, E. & Ruíz-Herrera, J. (1976). Synthesis of chitin by particulate preparations from *Aspergillus flavus*. Antonie van Leeuwenhoek. J. Microbiol. Serol. 42, 261-276.

- López-Romero, E., Bartnicki-García, S. & Rufz-Herrera, J. (1978). Purification and properties of an inhibitory protein of chitin synthase from *Mucor rouxii*. Biochim. Biophys. Acta. 525, 338-345.
- Lowry, O.H., Rosenbrowgh, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin-phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- Mahadevan, P.R. & Tatum, E.L. (1965). Relationship of the major constituents of the *Neurospora crassa* cell wall to wild-type and colonial morphology. J. Bacteriol. 90, 1073-1081.
- Mahadevan, P.R. & Tatum, E.L. (1967). Localization of structural polymers in the cell wall of *Neurospora crassa*. J. Cell Biol. 35, 295-302.
- Manocha, M.S. & Colvin, J.R. (1967). Structure and composition of the cell wall of *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 94, 202-212.
- McMurrough, I. & Bartnicki-García, S. (1971). Properties of a particulate chitin synthase from *Mucor rouxii*. J. Biol. Chem. 246, 4008-4016.
- McMurrough, I., Flores-Carreón, A. & Bartnicki-García, S. (1971). Pathway of chitin synthesis and cellular localization of chitin synthetase in *Mucor rouxii*. J. Biol. Chem. 246, 3999-4007.
- McMurrough, I. & Bartnicki-García, S. (1973). Inhibition and activation of chitin synthesis by *Mucor rouxii* cell extracts. Arch. Biochem. Biophys. 158, 812-816.
- Mill, G.L. & Cantino, E.C. (1980). The glycolipid involved in chitin synthesis by zoospores of *Blastocladiella emersonii* is a monoglucosyl-diacylglycerol. Exp. Mycol. 4, 175-180.
- Molano, J., Durán, A. & Cabib, E. (1977). A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated chitin. Analytical Biochem. 83, 648-656.

- Molano, J., Polacheck, I., Durán, A. & Cabib, E. (1979). An endochitinase from wheat germ. J. Biol. Chem. 254, 4901-1907.
- Peberdy, J.F. & Moore, P.M. (1975). Chitin synthetase in *Mortierella vinacea*, properties, cellular location and synthesis in growing cultures. J. Gen. Microbiol. 90, 228-236.
- Potgieter, H.J. & Alexander, M. (1965). Polysaccharide components of *Neurospora crassa* hyphal walls. Can. J. Microbiol. 11, 122-125.
- Powning, R.F. & Irzykiewics, H. (1965). Detection of chitin oligosaccharides on paper chromatograms. J. Chromatography 17, 621-623.
- Robertson, N.F. (1965). The fungal hypha. Trans. Br. Mycol. Soc. 48, 1-8.
- Ruíz-Herrera, J. & Bartnicki-García, S. (1974). Synthesis of cell wall microfibrils in vitro by a "soluble" chitin synthase from *Mucor rouxii*. Science 186, 357-359.
- Ruíz-Herrera, J., Sing, V.O., Van der Woude, W.J. & Bartnicki-García, S. (1975). Microfibril assembly by granules of chitin synthetase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 2706-2710.
- Ruíz-Herrera, J. & Bartnicki-García, S. (1976). Proteolytic activation and inactivation of chitin synthetase from *Mucor rouxii*. J. Gen. Microbiol. 97, 241-249.
- Ruíz-Herrera, J., López-Romero, E. & Bartnicki-García, S. (1977). Properties of chitin synthetase in isolated chitosomes from yeast cells of *Mucor rouxii*. J. Biol. Chem. 252, 3538-3543.
- Rupley, J.A. (1964). The hydrolysis of chitin by concentrated hydrochloric acid, and the preparation of low molecular-weight substrates for lysozyme. Biochim. Biophys. Acta 83, 245-255.

- Ryder, N.S. & Peberdy, J.F. (1977). Chitin synthetase in *Aspergillus nidulans*: properties and proteolytic activation. J. Gen. Microbiol. 99, 69-76.
- Schmit, J.D., Edson, C.M. & Brody, S. (1975). Changes in glucosamine and galactosamine levels during conidial germination in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 122, 1062-1070.
- Shepherd, M.G., Hasanah, M.G. & Sullivan, P.A. (1980a). N-Acetyl-D-glucosamine Kinase and germ-tube formation in *Candida albicans*. Exp. Mycol. 4, 147-159.
- Shepherd, M.G., Chiew, Y.Y., Ram, S.P. & Sullivan, P.A. (1980b). Germ-tube induction in *Candida albicans*. Canad. J. Microbiol. 26, 21-26.
- Singh, B.R. & Datta, A. (1978). Glucose repression of the inducible catabolic pathway for N-acetylglucosamine in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 58-64.
- Trevelyan, W.E., Procter, D.P. & Harrison, J.S. (1950). Detection of sugars on paper chromatograms. Nature, 166, 444-445.
- Trinci, A.P.J. (1978). Wall and hyphal growth. Sci. Prog. London 65, 75-99.
- Ulane, R.E. & Cabib, E. (1974). The activating system of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*: purification and properties of an inhibitor of the activating factor. J. Biol. Chem. 249, 3418-3422.
- Ulane, R.E. & Cabib, E. (1976). The activating system of chitin synthetase from *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and properties of the activating factor. J. Biol. Chem. 251, 3367-3374.
- Vogel, H.J. (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (medium N). Microbial Genetics Bull. 13, 42-43.

- Waechter, C.J. & Lennarz, W.J. (1976). The role of polyprenol-linked sugars in glycoprotein synthesis. Ann. Rev. Biochem. 45, 95-112.

- Zarain-Herzberg, A. & Arroyo-Begovich, A. (1981). Chitinolytic activity from *Neurospora crassa*. Sometido al J. Gen. Microbiol. para su revisión editorial.