

Formas inactivas de ureasa, de alto peso molecular, producidas por L-usnato sódico

C. Vicente, H. Guerra y M. T. Valle

Departamento de Fisiología Vegetal
Laboratorio de Fisiología de Líquenes
Facultad de Ciencias
Salamanca (España)

(Recibido el 11 de abril de 1973)

C. VICENTE, H. GUERRA and M. T. VALLE. *Inactive High Molecular Weight Forms of Urease Produced by Sodium L-usnate*. Rev. esp. Fisiol., 30, 1-4. 1974.

Crystalline urease is inactivated by the sodium salt of L-usnic acid. This inactivation is accelerated by urea and L-cysteine. The effect of the drug seems to be in relation to the formation of high molecular weight aggregates.

El ácido úsnico y sus sales sódica y potásica tienen actividad antibiótica sobre bacterias Gram positivas, pero no sobre Gram negativas (4). Esta actividad parece estar en relación con su capacidad de desacoplar la fosforilación oxidativa (1). Aunque el L-usnato sódico no presenta actividad antibiótica a bajas concentraciones (0-14 $\mu\text{g/ml}$) sobre *Proteus mirabilis*, previene la manifestación de algunas actividades enzimáticas, la ureasa por ejemplo (9). Este efecto parece estar relacionado con una inactivación del enzima por el antibiótico.

Se conocía la posibilidad de formación de agregados de ureasa, de alto peso molecular, disolviendo el enzima únicamente en tampón y existiendo una pérdida de actividad paralela al incremento de peso molecular. Estos agregados podían ser disociados por sulfito (5), 2-mercaptoctanol (8) o glicerol (2).

En el presente trabajo se demuestra que la inactivación de ureasa por L-usnato sódico está en relación con la formación de estados de agregación, ocasionalmente insolubles, y se investiga de qué manera se lleva a cabo esta agregación.

Material y métodos

La inactivación del enzima, ureasa cristalina tipo III de Sigma Chemical Co., se lograba incubando a 37°, durante 15 ó 30 minutos, según los casos, y en un volumen final de 5 ml, 2 mg de ureasa y 70 μg de L-usnato sódico, estando disuelto el antibiótico en ClNa al 2,5 %. El pH de la mezcla era de 6,9, mantenido con tampón fosfato 75 mM. Ocasionalmente, se incluía en la mezcla de incubación 0,1 milimoles de urea ó 0,1 milimoles de L-cisteína, sin modificar el volumen final. La actividad era medida incubando 1 ml

de la mezcla anterior, a la misma temperatura, con 100 μ moles de urea y 140 μ moles de fosfato, pH 6,9, en un volumen final de 3 ml durante 5 minutos. El amoníaco producido se recogía por el método de microdifusión de CONWAY (6), valorándolo por el método de NESSLER (11), midiendo el color desarrollado a 440 nm.

Las cromatografías fueron realizadas sobre papel Whatman n.º 1, en un sistema descendente con n-butanol-acético glacial-agua (4:1:1), usando como revelador ninhidrina-colidina (3). Las proteínas fueron determinadas por el método de LOWRY *et al.* (7).

El L-usnato sódico fue preparado en este laboratorio de acuerdo con las instrucciones de SHIBATA (10), a partir de ácido L-úsico (Usno).

Resultados y discusión

En la tabla I se muestra el grado de inactivación del enzima por L-usnato sódico y el efecto que la urea y L-cisteína tienen sobre tal inactivación. La presencia de urea en la mezcla de incubación acelera la inactivación del enzima, así como la presencia de L-cisteína. La incapacidad del aminoácido para proteger al enzima de la inactivación indicaría en principio que se debe excluir la acción del L-usnato sódico sobre los grupos -SH. La aceleración del proceso por urea sugeriría una mayor capacidad de actuación del antibiótico sobre la estructura del complejo urea-ureasa.

La presencia de glicerol en la mezcla de incubación (9:1 v/v) previene en un discreto porcentaje la inactivación del enzima; mientras que el 2-mercaptoetanol aceleraba la inactivación, concordando este efecto con el encontrado para la L-cisteína.

Se podría pensar que el proceso de inactivación era una función del incremento de peso molecular de la proteína. Esto podía ser corroborado por el hecho de que, incubando durante 90 minutos el

enzima con el inactivador, en presencia de L-cisteína en las condiciones indicadas, dos tercios de la proteína permanecen insolubles. Dos horas de incubación son suficientes para precipitar toda la proteína presente en la preparación.

Pasando por una columna de Sepharosa 6B dos preparaciones de ureasa soluble, una activa y otra inactiva, ésta era eluida en un solo pico de proteína 32 ml antes que el pico de ureasa activa (fig. 1). De acuerdo con estos resultados, la forma inactiva de ureasa sería un agregado de peso molecular más alto que el de la forma activa.

Para investigar cuáles pudieran ser los puntos de unión entre las diferentes cadenas polipeptídicas para la formación de los agregados de ureasa, se incubaba ésta con L-usnato sódico en ausencia de L-cisteína, añadiendo a la mezcla de incubación 10 mg de diferentes aminoácidos. Cuando estos aminoácidos eran L-alanina

Tabla I. *Inactivación de ureasa por L-usnato sódico.*

El glicerol se incluye en la mezcla de incubación de tal manera que en el volumen final de 5 ml está en la proporción de 9:1 v/v. La incubación de todos los compuestos en cada una de las mezclas de reacción se lleva a cabo durante 30 minutos a 37° y pH 6,9. La unidad de actividad específica se define como μ mol de amoníaco producido/mg de proteína y minuto, siendo 0,005 unidades el límite de sensibilidad del método.

Mezcla de incubación	Sin glicerol		Con glicerol	
	Actividad específica, vación Unid.	Inactivación (%)	Actividad específica, vación Unid.	Inactivación (%)
Ureasa sola	48,5	—	48,5	—
Ureasa + L-usnato sódico	17,1	64,7	28,5	41,3
Ureasa + urea + L-usnato sódico	6,42	86,8	10,8	77,7
Ureasa + L-cisteína + L-usnato sódico	<0,005	100,0	7,5	85,5

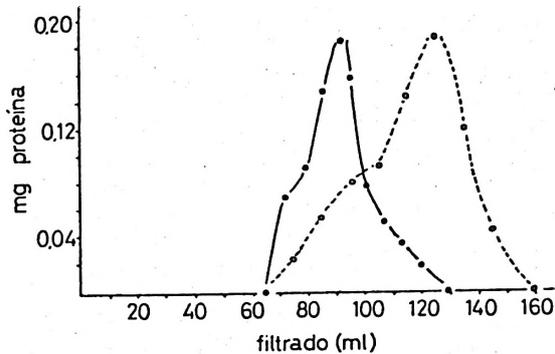


Fig. 1. Diagrama de filtración de ureasa inactiva y ureasa activa a través de una columna de Sepharosa 6B.

La ureasa inactiva (●) se preparaba incubando 0,7 mg de ureasa (○) durante 30 minutos a 37° con L-usnato sódico y L-cisteína en las condiciones descritas y dializados posteriormente frente a tampón fosfato 75 mM de pH 6,9, ajustando el volumen final a 10 ml. La columna, de 21 cm de altura por 2 cm de diámetro, estaba equilibrada con idéntico tampón. La elución se llevaba a cabo haciendo pasar por la columna fracciones de 10 ml del mismo tampón con el que había sido equilibrada.

y L-prolina, la presencia de ambos prevenía la inactivación del enzima por el antibiótico (tabla II), lo que indicaría que L-prolina y L-alanina interaccionan con el antibiótico en la cadena polipeptídica como puntos de unión para la formación de agregados de alto peso molecular.

Esta hipótesis fue confirmada por la formación de un complejo entre L-alanina, L-prolina y L-usnato sódico. Incubando 10 mg de ambos aminoácidos con 140 µg de L-usnato sódico en un volumen final de 10 ml durante 10 horas a 37°, tamponada la mezcla a pH 6,9 con tampón fosfato 75 mM, la cromatografía en papel del producto, después de pasarlo por una columna de Sephadex G-15, de 21 cm de altura por 2 cm de diámetro equilibrada con agua destilada, revela una única mancha, de Rf 0,27, compuesta por L-alanina, L-prolina y L-usnato sódico. El uso de un revelador diferencial (3) demuestra que la mancha está compuesta de

Tabla II. Efecto de L-alanina y L-prolina sobre la inactivación de ureasa por L-usnato sódico.

La incubación se lleva a cabo durante 15 minutos a 37°. A las concentraciones y pH indicados en la tabla I, añadiendo en cada caso 10 mg de L-alanina o L-prolina.

Mezcla de incubación	Actividad específica (unidades)	Inactivación (%)
Ureasa sola	48,5	—
Ureasa + L-usnato sódico	37,3	33,0
Ureasa + L-alanina + L-usnato sódico	47,4	2,3
Ureasa + L-prolina + L-usnato sódico	29,3	39,7
Ureasa + ambos aminoácidos + L-usnato sódico	59,0	Activación

ambos aminoácidos, revelándose la presencia de L-usnato sódico en el complejo por su reacción positiva con cloramina T, como describe SHIBATA (10).

El papel de la L-cisteína en el proceso de inactivación de ureasa permanece desconocido. Este aminoácido no forma complejo con L-alanina y L-prolina en presencia de L-usnato sódico, ya que, incubando en las condiciones precedentes los cuatro compuestos y cromatografiados posteriormente, la L-cisteína se separa en una mancha de Rf 0,06 del complejo de Rf 0,27.

Resumen

La inactivación de ureasa por L-usnato sódico está en función de la formación de agregados de ureasa de alto peso molecular que pueden llegar a ser insolubles. Esta agregación entre las diferentes cadenas polipeptídicas es provocada por la unión de las diferentes cadenas entre sí, que enlazan, mediante el L-usnato sódico, por restos L-alanil y L-prolil.

Bibliografía

1. BERNALD, R., FELDOTT, G., y LARDY, H. A.: *Arch. Biochem.*, 28, 317, 1950,

2. BLATTER, D. P., CONTAXIS, C. C., y RITHEL, F. J.: *Nature*, **216**, 274, 1967.
3. BONDIVENNE, R., y BUSCH, N.: *J. Chromatograph.*, **29**, 349, 1967.
4. BUSTINZA, F.: *Endeavour*, **10**, 95, 1951.
5. CREETH, J. M., y NICHOL, L. W.: *Biochem. J.*, **77**, 230, 1960.
6. CONWAY, E. J.: *Microdiffusion Analysis and Volumetric Error*. Crosby Look Wood, London, 1957.
7. LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L., y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 1951.
8. MAMIYA, G., y GORIN, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 382, 1965.
9. MANSO, R., y VICENTE, C.: *Microbiol. Española.*, **24**, 123, 1971.
10. SHIBATA, S.: En «Modern Methods of Plant Analysis». Vol. 6 (PAECH, K., y TRACEY, M. V., ed.), Springer Verlag, Berlín, 1963, p. 155.
11. STANDARD METHODS, American Public Health Association Inc., New York, 1955, p. 390.
12. SYNGE, R. L. M.: *Biochem. J.*, **39**, 351, 1945.