

## Purificación y propiedades de una $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa aislada de las gónadas del *Mytilus edulis* (mejillón)\*

P. Sánchez-Mozo, M. Freire, R. Vázquez-Pernas y M. Ruiz-Amil

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Farmacia  
Santiago de Compostela  
(España)

(Recibido el 3 de mayo de 1977)

P. SANCHEZ-MOZO, M. FREIRE, R. VAZQUEZ-PERNAS AND M. RUIZ-AMIL. *Purification and Properties of  $\beta$ -N-Acetylglucosaminidase from Mytilus Edulis L. Gonads. Rev. esp. Fisiol., 34, 119-126, 1978.*

$\beta$ -N-Acetylglucosaminidase ( $\beta$ -2-acetamido-2-deoxy-D-glucoside acetamidodeoxyglucohydrolase EC 3.2.1.30) from *Mytilus edulis* gonads and a homogenous protein was obtained from it by ion-exchange chromatography, gel filtration and disc electrophoresis. The apparent molecular weight, determined by gel filtration was  $140,000 \pm 5,000$ . Two subunits were identified. The molecular weights of both subunits calculated by disc-electrophoresis were 70,000 and  $75,000 \pm 2,000$ . Maximal activity for pH was 4.2. At 50° C the enzyme was still active; at 60° C inactive. The values of the apparent  $K_m$ 's proved to be 0.57 mM and 0.076 mM for p-nitrophenyl- $\beta$ -D-N-acetylglucosaminide and p-nitrophenyl- $\beta$ -D-N-acetylgalactosaminide as substrates. In the incubation of the enzyme with hyaluronic acid, chitin, deacetylated glycol-chitin and p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucuronide, N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine and glucuronic acid were not liberated. N-acetylgluconolactone and N-acetylgalactonolactone are competitive inhibitors for the enzyme.

La  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa ( $\beta$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucósido acetamidodesoxiglucosidrolasa EC 3.2.1.30), profusamente repartida en diferentes organismos, ha sido objeto de numerosos trabajos (2, 4-6, 9, 13, 17, 21, 22). En muchas preparaciones enzimáticas purificadas han

sido puestas de manifiesto varias formas enzimáticas, generalmente dos formas principales (formas A y B) (8, 15, 18), las cuales intervienen en las reacciones degradativas de mucopolisacáridos y glucolípidos (18).

Dado que en el hepatopáncreas y en las gónadas del mejillón existen  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas muy activas, es posible que estos enzimas realicen funciones diferentes. El enzima de origen gonadal, por su localización y elevada actividad,

\* Trabajo realizado con una beca de investigación en equipo de la «Fundación Juan March».

superior a la de las demás glucidasas presentes en el mismo tejido (17), probablemente está relacionado con la degradación final del ácido hialurónico (11, 12, 16).

La purificación y estudio de las propiedades de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de gónadas, objeto de la presente publicación, ha sido realizada con el objeto de dilucidar si se trata de un enzima similar a otra  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, incluida la del hepatopáncreas del molusco, o bien posee características diferentes.

### Material y métodos

**Reactivos.** Los p-nitrofenilglucósidos de la  $\beta$ -N-acetilglucosamina,  $\beta$ -N-acetilgalactosamina, ácido  $\beta$ -D-glucurónico, junto con quitina, glicol-quitina desacetilada y ácido hialurónico, procedían de Sigma. 2-Acetamido-2-desoxi-gluconolactona y 2-acetamido-2-desoxigalactonolactona de Koch Light Lab. Las proteínas empleadas en la determinación de pesos moleculares los suministró Serva. Otros productos químicos utilizados eran de grado analítico.

**Material biológico.** Se utilizaron gónadas de mejillón del N.O. de España previamente depurados. Para evitar cualquier alteración de los enzimas, este material se manejó fresco o previamente congelado.

**Ensayos de actividad enzimática.** Siguiendo el procedimiento de BOROAH modificado (3), se incubó una mezcla formada por 0,4 ml de solución amortiguadora de citrato 0,05 M (pH 4,2), 1 ml de sustrato (1 mM) y 0,1 ml de extracto enzimático. La reacción se detuvo añadiendo 2 ml de  $\text{CO}_3\text{Na}_2$ , 0,3 M, midiendo la densidad óptica en un espectrofotómetro PYE-UNICAN SP 1800 a 410 nm.

En los ensayos de actividad con ácido hialurónico, quitina y glicol-quitina desacetilada, como sustratos, las mezclas de reacción estaban formadas por 0,4 ml de

solución amortiguadora, 1 mg/ml de sustrato y 0,1 ml de enzima. Se efectuaron ensayos a pH 4,2 (sol. amortiguadora citrato) y a pH 7 (sol. amortiguadora fosfato). Los tiempos de incubación fueron de 30 min, 12 h y 24 h. En los ensayos con quitina, el polisacárido permaneció insoluble. La temperatura de incubación en los diferentes ensayos fue de 30°. La reacción se detuvo calentando la mezcla en agua hirviendo durante 3 min. El volumen de la mezcla se completó a 3,5 ml. La identificación de los productos de hidrólisis se efectuó por cromatografía en capa fina.

Como soporte se utilizó gel de sílice sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm. El líquido de desarrollo consistió en una mezcla de propanol-etanol-agua (25-27-25) (v/v). El revelado se hizo con anisaldehído (20) y como testigos se usaron  $\beta$ -D-N-acetilglucosamina y ácido  $\beta$ -D-glucurónico.

La unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la hidrólisis de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato en 1 min a 30° C y pH 4,2.

El contenido en proteínas se midió por el método de LOWRY *et al.* (10).

**Método de purificación.** El homogeneizado de gónadas obtenido en una trituradora de cuchillas de alta velocidad se extrajo con agua destilada (3 ml/g de tejido fresco). Después de centrifugar a 20.000 g durante 45 min el sobrenadante se fraccionó sucesivamente con sulfato amónico al 30 y 70 % de saturación. El precipitado de este fraccionamiento redisoluelto en solución amortiguadora citrato 0,01 m (pH 4,6) se dializó frente al mismo amortiguador y se depositó en una columna de CM-Sephadex (3 x 40 cm). La elución se efectuó con la solución tampón conteniendo un gradiente lineal de  $\text{ClNa}$  (0-0,3 M), recogiendo volúmenes de 5 ml.

Las fracciones de mayor actividad enzimática, concentradas con sacarosa sóli-

da, se cargaron en una columna de DEAE-Sephadex ( $3 \times 40$  cm) eluyéndose con solución amortiguadora fosfato 0,01 M (pH 6,5) conteniendo un gradiente lineal de ClNa (0,03 M).

Las fracciones más activas eluidas en la etapa precedente, recogidas en volúmenes de 3 ml y concentradas con filtros Amicon B-15, se depositaron en una columna de Sephadex G-150 ( $2 \times 80$  cm). La elución se efectuó con sol. amortiguadora fosfato 0,01 M (pH 6,5) conteniendo ClNa 0,1 M. Los eluatos con mayor actividad recogidos en volúmenes de 3 ml se concentran con filtros Amicon B-15 y se someten a una electroforesis sobre gel de poliacrilamida.

La electroforesis se realizó siguiendo la técnica de ORNSTEIN y DAVIS (14). Con fines preparativos se usaron geles al 6% en columnas de  $0,7 \times 7$  cm. La proteína enzimática se extrajo de las rodajas del gel con sol. amortiguadora citrato 0,01 M (pH 4,2) y en el extracto se determinó la actividad enzimática. La identificación de las bandas activas se efectuó por el procedimiento descrito por GABRIEL (7).

Todas las etapas de la purificación se llevaron a cabo a la temperatura de  $4^\circ$  C.

*Determinación de pesos moleculares.* El peso molecular del enzima se calculó por el método de ANDREWS (1), con Sephadex G-150. El calibrado de la columna se hizo con globulina, seroalbúmina, ovoalbúmina, quimotripsinógeno A, mioglobina y citocromo C.

La determinación del peso molecular

de las subunidades y su identificación se efectuó siguiendo el procedimiento de WEBER y OSBORN (25). El calibrado de los geles se realizó utilizando las mismas proteínas citadas en líneas anteriores.

## Resultados

La  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de gónadas de mejillón (*Mytilus edulis* L.) se purificó 2.862 veces con un rendimiento del 2% (tabla I). Se obtuvo libre de actividades glucidásicas contaminantes, por electroforesis analítica sobre gel poliacrilamídico como una proteína homogénea, constituida por una sola forma molecular (fig. 1, A) de peso determinado con Sephadex G-150 de  $140.000 \pm 5.000$  daltons (fig. 2).

Por el método de WEBER y OSBORN se identificaron en la proteína enzimática dos subunidades, de peso molecular de 70.000 y  $75.000 \pm 2.000$  daltons, calculados por electroforesis de disco (figs 1, B, y 3).

El enzima hidroliza el p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilglucosaminidósido y el p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilgalactosaminidósido. Las  $K_m$  aparentes con relación a estos substratos, calculadas por el método de Lineweaver-Burk fueron 0,57 mM y 0,076 mM, respectivamente, y las  $V_{max}$  para ambos substratos  $1,6 \times 10^3$  y  $0,13 \times 10^3$  mU/mg.

La dependencia del enzima respecto al pH presenta un máximo de actividad a pH 4,2 en amortiguador citrato 0,05 M y con p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilglucosaminidósido como substrato (fig. 4). El enzima se inactiva totalmente a  $60^\circ$  C (fig. 5).

Tabla I. Purificación de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa aislada de las gónadas de mejillón.

Etapas	Activ. total (mU)	Volumen (ml)	Proteínas (mg/ml)	Activ. específica (mU/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Extracto crudo	79.560	612	19,0	6	100,0	1,0
Pp. con $SO_4(NH_4)_2$ (30-70 % de sat.)	56.160	270	16,8	12	70,5	1,8
Eluato cromat. CM-Sephadex	3.699	15	2,2	112	4,6	16,4
Eluato cromat. DEAE-Sephadex	3.140	13	0,28	862	3,9	126,0
Eluato filtración Sephadex G-150	1.703	7	0,012	19.464	2,1	2.862,0

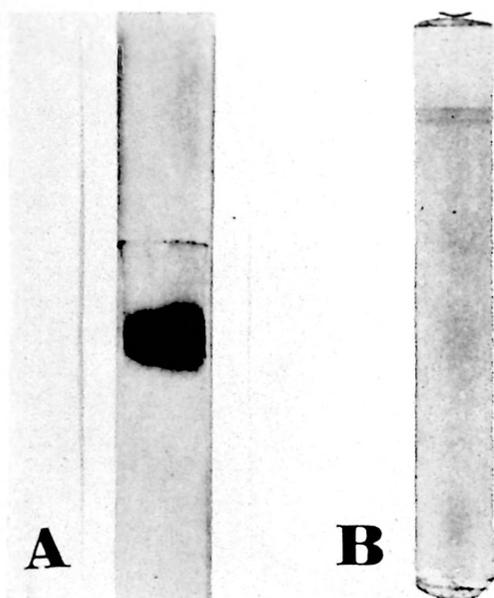


Fig. 1. Electroforegramas de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa y de sus dos subunidades.

A) Electroforesis con gel poliacrilamídico al 7,5 %, pH 8,3 y una corriente eléctrica de 5 mA por tubo durante 90 min. B) Gel poliacrilamídico con dodecilsulfato sódico. Desarrollo durante 4 h con una corriente de 6 mA por tubo. Tinción con azul de Coomassie.

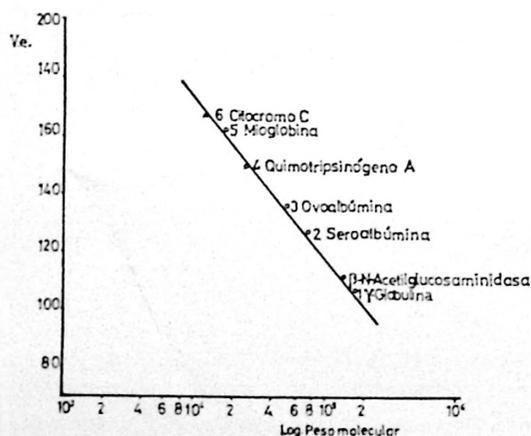


Fig. 2. Determinación del peso molecular de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa por filtración a través de Sephadex G-150.

Tamaño de la columna  $2 \times 80$  cm. Se equilibró con solución amortiguadora de fosfato 0,01 M, pH 6,5, con ClNa 0,1 M.

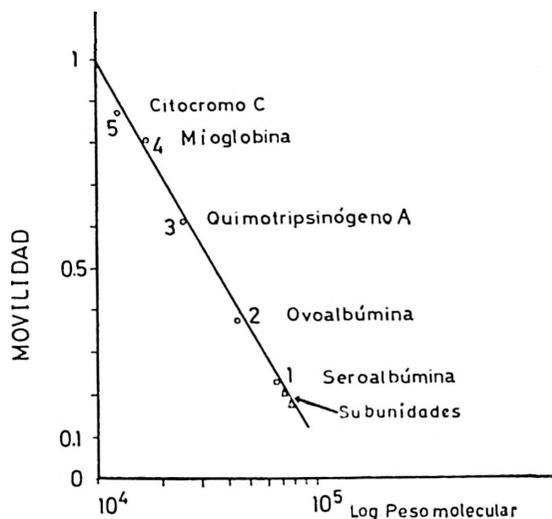


Fig. 3. Determinación del peso molecular de las subunidades por electroforesis sobre  $\xi$  gel poliacrilamídico con dodecilsulfato sódico.

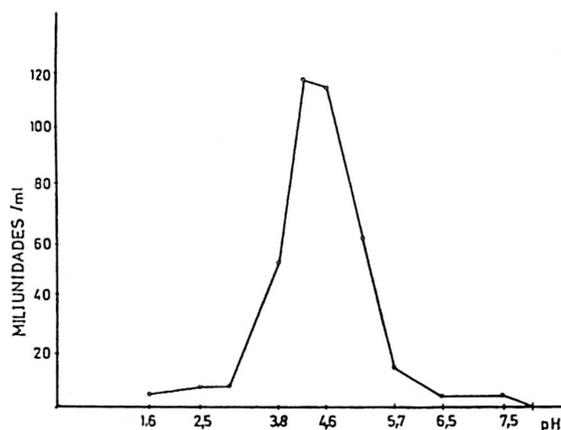


Fig. 4. Efecto del pH sobre la actividad enzimática de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa.

La 2-acetamido-2-desoxiglucosinolactona y la 2-acetamido-2-desoxigalactonolactona son inhibidores competidores del enzima a concentraciones 10 y  $3,3 \mu\text{M}$ , respectivamente, cuando se utiliza el p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilglucosaminidósido como sustrato. El cloruro mercúrico actúa como un inhibidor no competitivo utilizando el mismo sustrato (tabla II).

En diferentes experimentos realizados

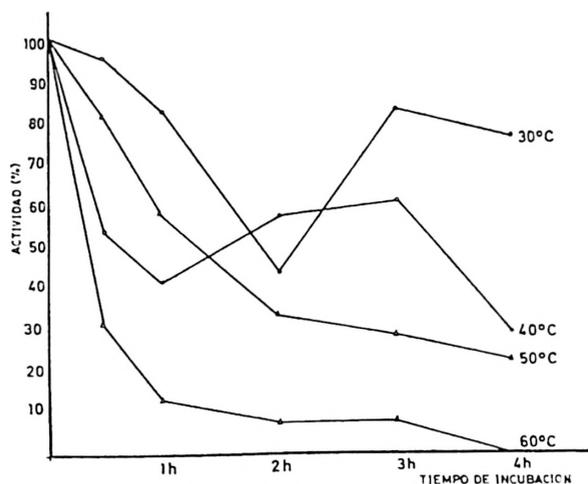


Fig. 5. Estabilidad de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa a diferentes temperaturas.

en las condiciones de ensayo descritas, el enzima se mostró inactivo frente al ácido hialurónico, quitina, glicol-quitina desacetilada y p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucurónido, no habiendo podido ser identificados  $\beta$ -N-acetilglucosamina, oligosacáridos y ácido glucurónico como resultado de la acción hidrolítica del enzima.

Tabla II. Constantes de inhibición de algunos compuestos que actúan como inhibidores de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de gónadas.

Inhibidores	$K_i$ ( $\mu$ M)
2-Acetamido-2-desoxiglucanolactona (10 $\mu$ M)	7,8
2-Acetamido-2-desoxigalactonolactona (3,3 $\mu$ M)	3,9
Cloruro mercúrico (4 $\mu$ M)	0,82

### Discusión

Las gónadas de *Mytilus edulis* contienen una  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa muy activa. El grado de purificación y porcentaje de recuperación conseguidos por el procedimiento descrito son, en general, superiores a los alcanzados con enzimas

de otras procedencias (2, 5, 6, 9, 13, 17, 21).

El enzima presenta actividad hexosaminidásica, propiedad en la que coincide con la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de hepatopáncreas y de otros materiales (5, 8).

En las etapas de fraccionamiento cromatográfico y por electroforesis en gel poliacrilamídico, se identifica una sola proteína enzimática, en contraste con la existencia de múltiples formas enzimáticas en diversas  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas (15).

El peso molecular aparente, determinado por filtración a través de Sephadex G-150 es de 140.000, ligeramente superior al del enzima de hepatopáncreas y del mismo orden de magnitud que los señalados para otras  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas (18, 23, 24).

Las  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas presentan una serie de pH óptimos comprendidos entre 3,1 y 7,5. El valor de máxima actividad del enzima se obtuvo a pH 4,2. La forma de la curva de pH actividad es diferente a la del enzima de hepatopáncreas y revela una mayor estabilidad del enzima de gónadas en la zona del pH óptimo (18).

Frente al calor, el comportamiento de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de gónadas concuerda con el del enzima de otros orígenes; pierden un 60% de actividad entre 40 y 50° C inactivándose totalmente a 60° C. A temperaturas de 30 y 40° C coincide con el de la forma I de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de hepatopáncreas (18), posiblemente motivado por cambios de conformación experimentados por la molécula enzimática.

Los valores de las  $K_m$  y de las  $V_{max}$ , determinados con los substratos p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilglucosaminidósido y p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilgalactosaminidósido, son del mismo orden de magnitud que los del enzima de hepatopáncreas (18) e inferiores, en general, a los descritos para el de otros orígenes (5, 9, 23, 24). Análogamente a lo que ocurre con diversas  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas, la de gónadas

posee mayor afinidad con el p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilgalactosaminidósido, si bien la  $V_{max}$  es menor.

Algunos compuestos ya conocidos como inhibidores de las  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasas (4, 5, 9, 18) también inhiben a la de gónadas, aunque con menos intensidad. El enzima es inhibido por competencia por la 2-acetamido-2-desoxiglucuronolactona y la 2-acetamido-2-desoxigalactonolactona, mientras que el cloruro mercuríco se comporta como un inhibidor no competidor. En ambos casos, el sustrato utilizado fue el p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilglucosaminidósido. La  $K_i$  para el cloruro mercuríco es de las más bajas de los hallados con los enzimas inhibidos por mercurio.

La inactividad mostrada por el enzima en los ensayos de incubación con ácido hialurónico, quitina y glicol-quitina desacetilada, sugiere que la función de la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de gónadas probablemente consiste en hidrolizar moléculas oligosacáridicas, originadas a partir de polisacáridos que contengan  $\beta$ -D-N-acetilglucosamina o  $\beta$ -D-N-acetilgalactosamina, interviniendo, por consiguiente, en las etapas finales de degradación de los polisacáridos. No obstante, para una justa valoración de los resultados obtenidos debe tenerse en cuenta que algunas propiedades y características estructurales de los sustratos impiden la consecución de unas condiciones generales de ensayo óptimas.

#### Agradecimiento

Agradecemos a la Depuradora Losada, de Villagarcía de Arosa, el suministro continuo de mejillones para su utilización como material biológico.

#### Resumen

Se purifica una  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa aislada de las gónadas del mejillón (*Mytilus edulis* L.), obteniéndose en forma de proteína ho-

mogénea, con un factor de purificación de 2.862 veces. Por electroforesis sobre gel poli-acrilamídico se confirma la existencia de una sola forma enzimática, la cual consta de dos subunidades. El peso molecular de la proteína enzimática determinado con Sephadex G-150 fue de  $140.000 \pm 5.000$  daltons. Los pesos moleculares de las subunidades obtenidos por electroforesis de disco fueron  $70.000$  y  $75.000 \pm 2.000$  daltons. La actividad máxima del enzima se manifiesta a pH 4,2. Los valores de las  $K_m$  aparentes con los sustratos p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilglucosaminidósido y p-nitrofenil- $\beta$ -D-N-acetilgalactosaminidósido son  $0,57$  mM y  $0,076$  mM, respectivamente. Incubando el enzima con ácido hialurónico, quitina, glicol-quitina desacetilada y p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucurónido no se ha puesto de manifiesto la separación de  $\beta$ -N-acetilglucosamina, ácido glucurónico y oligosacáridos. La 2-acetamido-2-desoxiglucuronolactona y la 2-acetamido-2-desoxigalactonolactona inhiben por competencia a la  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa de gónadas.

#### Bibliografía

1. ANDREWS, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222-233, 1964.
2. BAHL, O. P. y AGRAWAL, K. M. L.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2970-2978, 1969.
3. BOROAH, J., LEABACK, D. H. y WALKER, P. G.: *Biochem. J.*, **78**, 106-110, 1961.
4. CAYGILL, J. C., ROSTON, C. P. J. y JEVONS, F. R.: *Biochem. J.*, **98**, 405-409, 1966.
5. DILLARD, C. J. y TAPPEL, A. L.: *Biochem. Med.*, **11**, 275-289, 1974.
6. FINDLAY, J. y LEVY, G. A.: *Biochem. J.*, **77**, 170-175, 1960.
7. GABRIEL, O.: En «Methods in Enzymology» (W. B. Jakoby ed.), vol. 22. Academic Press. Nueva York, 1971, 578-604.
8. GEIGER, B. BEN-YOSEPH, Y. y ARNON, R.: *FEBS Letters*, **45**, 276-281, 1974.
9. LEABACK, D. H. y WALKER, P. G.: *Biochem. J.*, **104**, 70P, 1967.
10. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N., FARR, A. y RANDALL, R.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265, 275, 1951.
11. LUNT, M. R. y KENT, P. W.: *Biochem. Biophys. Acta*, **44**, 371-379, 1960.
12. MEYER, K. y RAPPORT, M. M.: En «Advances in Enzymology» (F. F. Nord, ed.), vol. 13. Forham University, Nueva York, 1952, 199-223.

13. MOLODTSOV, N. V. y VAFINA, M. G.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **41B**, 113-120, 1972.
14. ORNSTEIN, L. y DAVIS, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 321-349, 1964.
15. ROBINSON, D. y STIRLING, J. L.: *Biochem. J.*, **107**, 321-327, 1968.
16. RORIE, MC. R. A. y WILLIAMS, W. L.: *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 777-803, 1974.
17. SÁNCHEZ-MOZO, P., VÁZQUEZ-PERNAS, R. y RUIZ-AMIL, M.: *Acta Cient. Compostelana*, **10**, 175-192, 1973.
18. SÁNCHEZ-MOZO, P., FREIRE, M., VÁZQUEZ-PERNAS, R. y RUIZ-AMIL, M.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **58B**, 29-34, 1977.
19. SANDHOFF, K.: *FEBS Letters*, **11**, 342-344, 1970.
20. STHAL, E.: «Thin Layer Chromatography», Academic Press. Nueva York, 1965.
21. SU CHEN LI y YU TEN LI: *J. Biol. Chem.*, **245**, 5153-5160, 1970.
22. VÁZQUEZ-PERNAS, R. y CABEZAS, J. A.: *Abstracts of papers, FEBS 6th Meeting*, 1969, 928.
23. WADSTRÖM y HISATSUNE, K.: *Biochem. J.*, **120**, 725-754, 1970.
24. WALKER, P. G., WOOLLEN, J. W. y HEYWORTH, R.: *Biochem. J.*, **78**, 111-116, 1961.
25. WEBER, K. y OSBORN, M.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406-4412, 1969.

