

PROTEASAS EXTRACELULARES DE UNA CEPA ENTEROTOXIGENICA DE *VIBRIO CHOLERAE* NO 0:1

J. M. Navarro* & M. Gacto*

Recibido: octubre 1986

SUMMARY

Extracellular proteases from a *Vibrio cholerae* no 0:1 enterotoxigenic strain

The alkaline proteolytic system from a non-agglutinable strain of *V. cholerae* isolated from water has been analysed. Maximal levels of extracellular protease activity are produced during the stationary phase of growth. The proteolytic activity of the system shows a high stability and their synthesis appears to be partially repressed by glucose. The enzyme system is composed of four distinct proteolytic enzymes as evidenced by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis with copolymerized gelatin as substrate.

Keywords: Proteases - Vibrio - Fractionation - Electrophoresis.

RESUMEN

Se ha analizado el sistema proteolítico alcalino de una cepa de *V. cholerae* no aglutinable de origen ambiental. Los niveles máximos de actividad proteolítica extracelular se producen durante la fase estacionaria de crecimiento. El sistema enzimático es muy estable y sus síntesis es parcialmente reprimida por glucosa. La actividad proteolítica parece deberse a cuatro enzimas distintos según se evidencia mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS y gelatina copolimerizada como sustrato.

Palabras clave: Proteasas - Vibrio - Fraccionamiento - Electroforesis.

INTRODUCCIÓN

La importancia biológica de las proteasas de *Vibrio cholerae* 0:1 y su posible implicación en la patogénesis de este microorganismo parece bien documentada (FINKELSTEIN *et al.*, 1966; SCHNEIDER & PARKER, 1978; SCHNEIDER & PARKER, 1982). Sin embargo, los resultados de los estudios realizados son en ocasiones dispares. SCHNEIDER & PARKER (1982) han descrito la existencia de dos proteasas extracelulares de pesos moleculares 38 y 22 Kd. YOUNG & BROADBENT (1982) han puesto de manifiesto la presencia de una proteasa de 35 Kd y otra de peso molecular no determinado que parece relacionada con la activación de la toxina

colérica. La primera parece desdoblarse en ciertas condiciones en dos picos de actividad reconocibles por filtración en gel, lo que se interpreta como debido a la existencia de formas zimogénicas.

El sistema proteolítico de *V. cholerae* no 0:1 ha sido menos estudiado que el de cepas de serotipo 0:1 (MAITI *et al.*, 1981). Puesto que se admite que la principal diferencia entre estos microorganismos es precisamente la presencia del antígeno 0:1, sería de esperar que el modelo de producción de proteasas en ambos tipos fuera semejante. Para comprobar la validez de esta suposición, el presente estudio se inició con objeto de caracterizar de modo preliminar el sistema proteolítico extracelular de una cepa de *V. cholerae* no 0:1 de origen ambiental.

* Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Murcia.

MATERIALES Y MÉTODOS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL MICROORGANISMO

El microorganismo utilizado se aisló de una muestra de agua tomada de la desembocadura del río Segura en Guardamar (Alicante) mediante inoculación de la muestra en agua de peptona alcalina sin ClNa y resiembras en medio TCBS. Tras pase por medio TSA la cepa aislada se caracterizó respecto a las siguientes propiedades: oxidasa, reducción de nitratos, test O/F, arginina-dihidrolasa, lisina y ornitina-decarboxilasas, utilización de sacarosa, inositol y α -cetogluturato, crecimiento a 42 °C, movilidad y formación de *string* con deoxicolato. La toxigenicidad se ensayó por el método de SACK & SACK (1975) sobre cultivos de células adrenales Y-1 y por la prueba de acumulación de fluidos en el asa intestinal de ratón lactante. En ambos casos la cepa mostró características enterotoxigénicas. El serotipado se realizó con anticuerpos específicos y la cepa fue clasificada como perteneciente al grupo *no 0:1* o NAG (no aglutinable).

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

La determinación del crecimiento del microorganismo en medios de cultivo líquidos se realizó midiendo la turbidez del cultivo en un colorímetro Spectronic 20 a 600 nm.

MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios e ingredientes utilizados de origen comercial se obtuvieron de Difco u Oxoid. Otros ingredientes adicionales, en su caso, fueron de calidad analítica. El microorganismo se mantuvo rutinariamente en medio TSA a 25 °C con resiembras periódicas en TCBS.

ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

De todas las cepas aisladas de *V. cholerae* NAG según el anterior esquema, la analizada en este estudio fue seleccionada por la elevada producción de proteasas extracelulares atendiendo a su comportamiento en los siguientes ensayos cualitativos:

a) En placas de agar-gelatina (1%) se hicieron pocillos radiales que se llenaron con 0'1 ml de sobrenadante de un cultivo estacionario de cada una de las cepas a ensayar y pocillos centrales, que recibieron 0'1 ml de agua destilada como referencia. Tras incubación a 37 °C durante 12 h las placas se revelaron por inundación con negro amido al 0'5% en metanol-acético-agua (30:10:60, v/v) y se lavaron repetidamente con agua destilada. Las áreas de proteólisis se manifestaron como halos claros alrededor de los pocillos respectivos y el diámetro mayor fue registrado en el caso de la cepa seleccionada.

b) En placas conteniendo Lab-Lemco (0'3%), gelatina (0'3%), ClNa (0'5%) y agar (1'5%) a pH 7'5 las cepas se sembraron en estría y se incubó a 37 °C

durante 2 días inundando luego las placas con cloruro mercúrico al 15% en ClH al 10%. La producción de proteasas se estimó directamente observando la intensidad de la zona clara alrededor de la zona de crecimiento bacteriano, que fue más evidente en el caso de la cepa estudiada.

c) Sobre placas radiográficas Valca 90 AFW se colocaron 10 μ l de diluciones seriadas de sobrenadantes de cultivos estacionarios y se incubó en baño húmedo a 37 °C durante 15 min. A continuación se lavó con agua destilada y se detectó la actividad mediante la aparición de una zona traslúcida debida a que la gelatina de la emulsión fotográfica que resulta hidrolizada es arrastrada por el lavado con agua mientras el resto permanece adherida a la placa. La cepa seleccionada dio ensayos positivos por este método incluso a diluciones 10^{-2} de sus sobrenadantes de cultivo en medio BHI.

ANÁLISIS ENZIMÁTICO

Los ensayos enzimáticos cuantitativos se realizaron según una modificación del método de LONG *et al.* (1981). Como sustrato se utilizó una solución de azocaseína (Sigma) al 0'8% en Tris-ClH 50 mM pH 8'0 conteniendo 2mM de Cl_2Ca . La actividad proteolítica se valoró a 37 °C utilizando como fuente enzimática sobrenadantes de cultivo libres de células obtenidos por centrifugación de los cultivos líquidos a $15000 \times g$ durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall RC-5B. A 0'75 ml de la solución de sustrato se añadieron 0'25 ml de sobrenadante y tras el apropiado tiempo de reacción los ensayos se detuvieron por adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 10%. La mezcla se centrifugó de nuevo hasta separar el precipitado proteico no hidrolizado y se obtuvo el sobrenadante conteniendo grupos azo- covalentemente asociados a los productos solubles de reacción liberados del sustrato por el enzima. Tales grupos son prácticamente incoloros en solución ácida, por lo que a 1 ml de la mezcla de reacción se añaden 1'5 ml de NaOH 0'5N y el color desarrollado se mide a 440 nm frente a un blanco obtenido en las mismas condiciones que los ensayos problema pero en el que el ácido tricloroacético se añade antes que el sustrato al inicio de la reacción. Los valores de lectura se refirieron en cada caso a una recta patrón de azocaseína. La unidad enzimática se definió como la cantidad de enzima capaz de degradar y liberar al sobrenadante ácido el equivalente a 1 mg de azocaseína en 30 minutos en las condiciones de pH y temperatura descritas.

CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

Muestras de sobrenadantes de cultivo se sometieron a filtración molecular mediante columnas (50 \times 2 cm) de gel de Sephadex G-100 (Farmacia) equilibrado en tampón Tris-ClH pH 8'0 con 2 mM Cl_2Ca . Las muestras a cromatografiar se liofilizaron en un Thermovac TM 210 o se concentraron mediante cámaras Minicom 5B inmediatamente antes de su fraccionamiento. Las fracciones eluidas (3 ml) se recogieron mediante un colector Gilson TDC 80. La proteína

total se estimó por absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1. La columna se calibró usando los siguientes marcadores de peso molecular conocido: citocromo c, tripsina, ovoalbúmina y seroalbúmina bovina (Sigma).

ELECTROFORESIS EN CONDICIONES DE DESNATURALIZACIÓN REVERSIBLE

Se realizaron electroforesis discontinuas en gel de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización reversible según la técnica de HEUSSEN y DOWDLE (1980) que, en esencia, consiste en polemizar el gel incluyendo gelatina; la muestra enzimática es además parcialmente inactivada por tratamiento suave con dodecilsulfato sódico (SDS), sin calentamiento ni tratamiento con agentes reductores, y una vez realizada la electroforesis es renaturalizada por eliminación del SDS mediante Triton X-100. Las proteasas pueden entonces hidrolizar *in situ* la gelatina del gel y, mediante tinción con negro amido, se identifica su posición electroforética observando bandas blancas que corresponden a las zonas de desaparición de la gelatina copolimerizada. Los recorridos se realizaron en nevera a 4 °C utilizando rojo fenol como indicador y a una intensidad constante de 8 ó 20 mA.

RESULTADOS

La producción del sistema proteolítico fue ensayada en diversos medios de cultivo. La cepa seleccionada no mostró crecimiento ni producción de proteasa extracelulares en medio líquido con Triptona-NaCl (Oxoid). En medio mineral semisintético con Casaminoácidos (Difco) el crecimiento fue abundante, aunque tampoco se detectó producción de proteasas. Por el contrario, en medio líquido BHI (Oxoid) el microorganismo creció con facilidad, observándose en estadios avanzados de la fase estacionaria un descenso en la absorbancia del cultivo debido a autoaglutinación celular; en este medio, en particular, la producción de proteasas fue elevada, comenzando su producción en la fase exponencial tardía y alcanzando niveles máximos en la fase estacionaria (fig. 1).

La naturaleza extracelular del sistema se comprobó como se indica a continuación. Un cultivo en medio BHI del microorganismo en fase estacionaria se dividió en dos parte idénticas, una de las cuales se centrifugó hasta obtener por separado el sobrenadante y el sedimento celular; las células obtenidas fueron resuspendidas de nuevo en medio BHI y se realizó un triple ensayo de actividad con el cultivo completo no fraccionado, con el sobrenadante obtenido de una parte de dicho cultivo y con las células resultantes tras la resuspensión. En este último caso la actividad fue prácticamente nula, mientras que en los dos primeros ensayos se

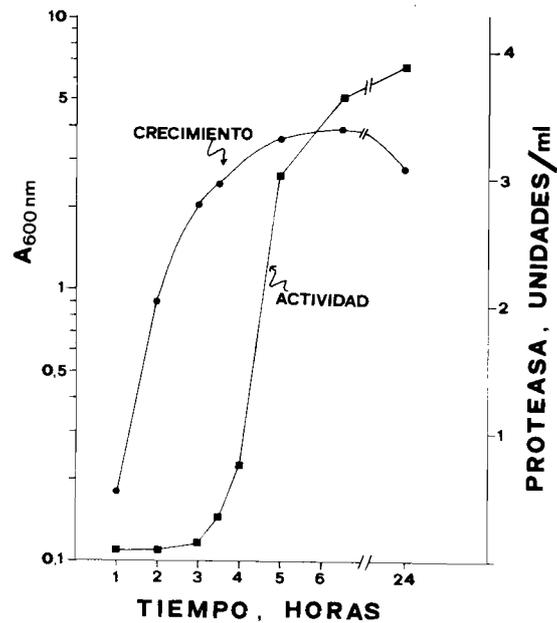


FIGURA 1. Crecimiento de *V. cholerae* y actividad exoproteolítica en cultivo en medio BHI a 37 °C con agitación.

Growth of *V. cholerae* and exoproteolytic activity in BHI medium at 37 °C with shaking.

registraron los mismos valores, lo que constituye una indicación acerca de la práctica inexistencia de enzima retenido periplásmicamente o ligado a la pared celular. En consecuencia, el sistema se considera de naturaleza fundamentalmente extracelular.

Se analizó *in vitro* el efecto de algunos factores sobre la actividad enzimática del sistema. En condiciones de ensayo, la actividad enzimática fue más notable a valores alcalinos de pH. Dentro de la zona comprendida entre pH 7 y 9 el sistema mostró su máximo de actividad a pH 8.4. En lo que respecta a la influencia de la temperatura, la actividad máxima en condiciones de reacción se obtuvo a una temperatura de 60 °C (fig. 2). Se estudió así mismo la termoestabilidad del sistema enzimático precalentando muestras del mismo durante 10 min a distintas temperaturas y ensayando luego la actividad a 37 °C. Los resultados indican (fig. 2) que a la temperatura standard de reacción el sistema es estable. El sistema aún retiene aproximadamente el 50% de la actividad alrededor de 62 °C y se inactiva completamente a temperaturas superiores a los 70 °C.

Por otra parte, la liofilización o diversos ciclos de congelación y descongelación no provocaron

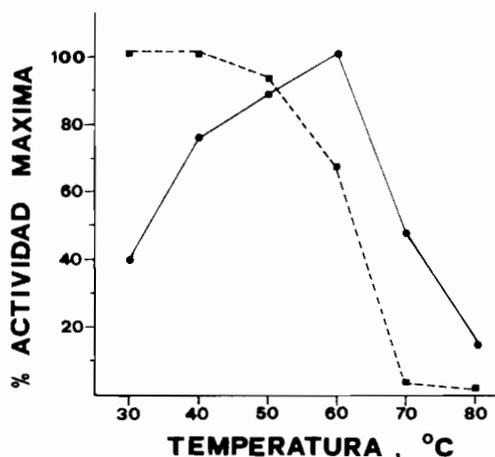


FIGURA 2. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica (línea continua) y sobre la termostabilidad enzimática (línea discontinua). Para el estudio de la termostabilidad, el sistema se sometió a pretratamientos de 10 min a las temperaturas indicadas y se realizó a continuación la reacción en las condiciones standard.

Effect of temperature on the proteolytic activity (continuous line) and enzyme stability (discontinuous line). To study the thermostability, the system was subjected to 10 min pretreatments at the temperatures shown and the enzyme reactions carried out thereafter under standard conditions.

ningún efecto aparente sobre la actividad enzimática, revelando una notable estabilidad del sistema. El sistema no mostró, además, variación en la actividad tras ser sometido a diálisis prolongada a 4 °C frente a agua desionizada, lo que indica la ausencia de requerimientos iónicos específicos para su estabilidad. El Ca^{++} , que constituye un componente rutinariamente incluido en los ensayos de reacción de muchas proteasas, no tiene ninguna influencia en este caso ni sobre la estabilidad ni sobre la actividad enzimática del sistema.

Se ensayó, así mismo, el efecto de otros cationes e inhibidores potenciales de proteasas, adicionados a la mezcla de reacción conteniendo enzima dializado. Los resultados (tabla 1) indican que, entre los metales, la máxima capacidad inhibitoria la desarrolla el Hg^+ . Entre los inhibidores clásicos de proteasas, ninguno parece afectar la actividad de forma destacable y tan sólo la cisteína parece desarrollar un efecto de inhibición parcial significativa.

Para comprobar la posible regulación de la síntesis del sistema exoproteolítico mediante represión catabólica por fuente carbonada se inoculó una dilución 1:100 de un cultivo en fase estacionaria temprana en distintos matraces

TABLE 1. Efecto de diversos cationes e inhibidores sobre la actividad del sistema exoproteolítico.

Effect of several cations and inhibitors on the enzyme activity of the proteolytic system.

ADICIÓN	CONCENTRACIÓN (mM)	% ACTIVIDAD RELATIVA
Ninguna	—	100
Hg^+	1	35
Ag^+	1	75
Zn^{++}	1	59
Cu^{++}	1	68
Fe^{++}	1	77
Iodoacetato	1	103
Iodoacetato	2.5	90
Cisteína	1	80
Cisteína	2.5	67
Citrato	1	100
EDTA	1	105
EDTA	5	99
EDTA	10	93
PMSF	2	86

conteniendo BHI suplementado con cantidades variables de glucosa. Los cultivos se incubaron durante 6 h y se estimó a continuación la actividad y el crecimiento. Los resultados muestran que la adición de glucosa originó un aumento en la tasa de crecimiento y un descenso en la producción de proteasa extracelular, tanto en unidades enzimáticas por mililitro como en unidades por densidad celular fija medida por

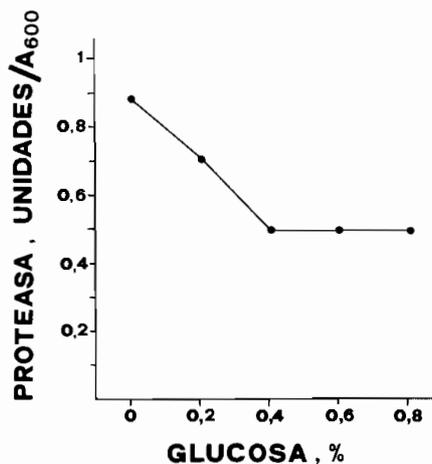


FIGURA 3. Efecto de la glucosa en la producción de exoproteasas. Para detalles experimentales, ver texto.

Effect of glucose on the production of exoproteolytic activity. For experimental details, see text.

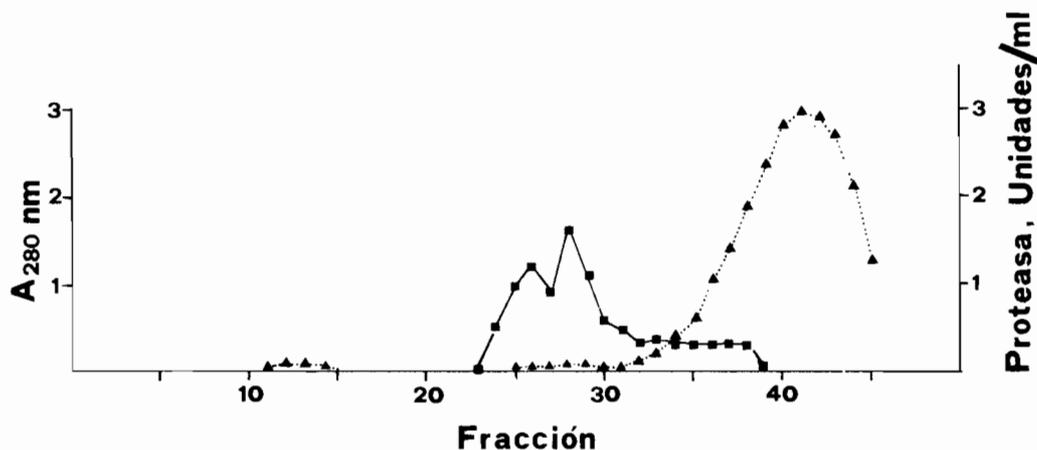


FIGURA 4. Fraccionamiento de sobrenadantes de cultivo en columna de Sephadex C 100. Línea continua: actividad proteolítica sobre azocaseína; línea discontinua: proteína total como absorbancia a 280 nm. En las fracciones no representadas la actividad proteolítica fue nula y la cantidad de proteína muy baja ($A_{280} < 0.05$).

Elution pattern of supernatants from cell cultures throughout a column of Sephadex G100. Continuous line: proteolytic activity on azocasein. Discontinuous line: total protein measured as absorbance at 280 nm. In fractions with results not shown, the enzyme activity was null and the amount of protein very low ($A_{280} < 0.05$).

absorbancia a 600 nm. Este efecto no aumentó a concentraciones de glucosa presente superiores a 0.4% (fig. 3).

El fraccionamiento del sistema mediante filtración en gel de Sephadex G100 mostró la aparición de dos picos de actividad mayoritaria, con elución muy próxima, y una larga zona de actividad residual de elución posterior (fig. 4). Los pesos moleculares aparentes de los componentes principales, obtenidos por calibración con proteínas de peso molecular conocido, fueron 37 y 29 Kd.

Todas las fracciones obtenidas por filtración se ensayaron simultáneamente para actividad proteolítica tanto por el método standard de valoración como por el método cualitativo sobre placa radiográfica. En estos ensayos se comprobó que, en todos los casos, las fracciones resultaban positivas por los dos métodos o bien negativas por ambos, lo que sugiere que estos enzimas tienen tanto actividad gelatinolítica como caseinolítica.

La electroforesis del sistema en condiciones de desnaturalización reversible reveló la aparición de al menos cuatro bandas reconocibles correspondientes a cuatro enzimas extracelulares distintos (fig. 5). La primera banda deja aparentemente tras de sí un rastro de gelatina parcialmente degradada que parece deberse a una insuficiente desnaturalización enzimática durante el recorrido, ya que en ensayos paralelos con el sistema enzimático desnaturalizado

por calor no se apreció ninguna huella de gelatinolisis.

DISCUSIÓN

Dos han sido los objetivos que se han pretendido cubrir en este trabajo. Por un lado, caracterizar globalmente el sistema proteolítico extracelular de una cepa de *V. cholerae* no 0:1 y compararlo con el descrito en la bibliografía para otras cepas de la misma especie por análisis mediante otras técnicas, y por otro, adaptar un método electroforético inicialmente descrito para detección de activadores de plasminógeno (HEUSSEN & DOWLE, 1980) a la detección de proteasas microbianas.

La mayor parte de las proteínas que secretan las bacterias son enzimas, y de éstas la mayor parte suelen ser proteasas (AUNSTRUP, 1980). Los datos sobre la caracterización del sistema proteolítico extracelular de la cepa estudiada indican que los dos enzimas con mayor actividad, de los cuatro detectados por electroforesis con actividad proteolítica, exhiben pesos moleculares de 37 y 29 Kd por filtración en gel. Estos resultados coinciden razonablemente con los de MAITI *et al.* (1981), que analizaron los patrones de producción de exoproteínas en varios biotipos de *V. cholerae*. En las dos cepas de *V. cholerae* no 0:1 estudiadas por dichos autores se detectaron en SDS-PAGE cuatro

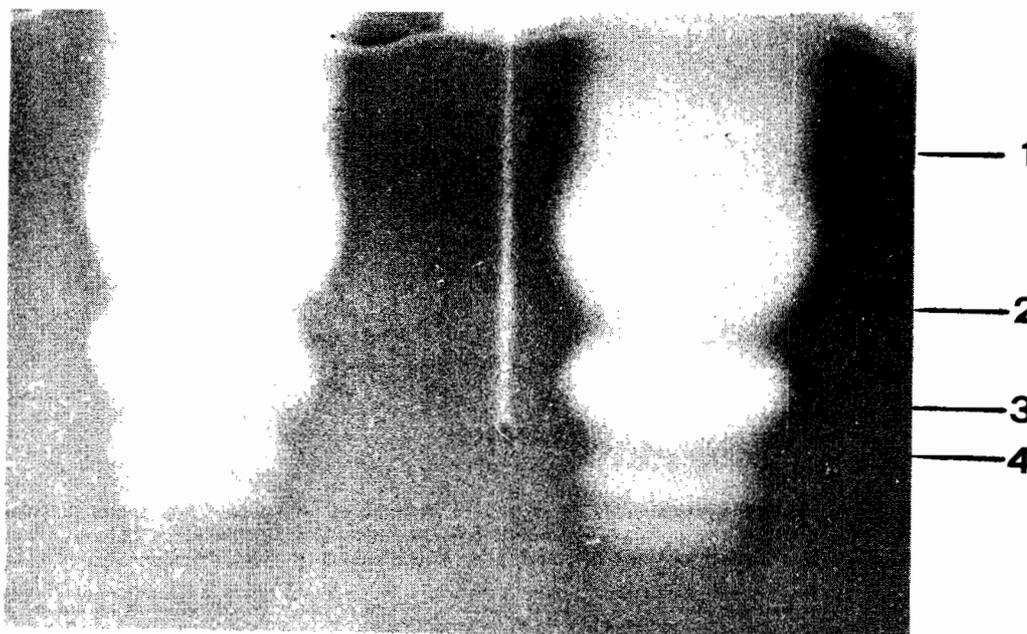


FIGURA 5. Modelo electroforético en placa con gelatina copolimerizada del sistema proteolítico, según el método de HEUSSEN & DOWLE (1980) a 8 mA.

Electrophoretic pattern of the proteolytic system in a slab gel with copolymerized gelatin according to the method of HEUSSEN & DOWLE (1980) at 8 mA.

bandas correspondientes a pesos moleculares de 15, 24, 31 y 37 Kd. Se puede asumir, en consecuencia, la posible homología entre las dos bandas de mayor peso molecular detectadas por MAITI *et al.* (1981) y las de 37 y 29 Kd detectadas en la cepa analizada por nosotros. Las otras dos bandas con actividad minoritaria, de pesos moleculares inferiores, parecen corresponder a la zona de actividad residual que se evidencia por cromatografía en columna tras la elución de los picos mayoritarios (fig. 4). Esta actividad posiblemente se correlacione con las bandas de 24 y 15 Kd encontradas por MAITI *et al.* (1981). Parece, por tanto, haber poca variabilidad en cuanto a las proteasas extracelulares en estas dos cepas de *V. cholerae* no 0:1 analizadas independientemente.

No está claro si realmente el patrón detectado revela cuatro enzimas independientes o si algunas bandas electroforéticas corresponden a formas parcialmente degradadas, con actividad enzimática y derivadas de los otros componentes mayoritarios. Tal situación ha sido descrita en sistemas análogos (YOUNG & BROADBENT, 1982). Sin embargo, la estabilidad del patrón obtenido bajo diversas circunstancias (congelación y descongelación, incubación pre-

via..., etc.) apoyan la existencia independiente de los enzimas detectados.

Los resultados respecto a la regulación del sistema por represión catabólica parecen sustentar la idea de una regulación compleja. Aunque existe una correlación inversa entre crecimiento celular y producción de exoproteasas (fig. 3), la mera presencia de glucosa no parece inhibir totalmente esta producción, ya que las células estacionarias muestran un cierto nivel de producción independientemente de la presencia de glucosa en exceso. Esta situación sugiere que sólo la síntesis de algunas especies moleculares del sistema está sujeta a represión catabólica y constituye una evidencia indirecta adicional del carácter multicomponente del sistema.

La adecuación del método electroforético de HEUSSEN & DOWLE (1980) ha resultado ser un instrumento útil de análisis para la detección de proteasas microbianas. El protocolo previamente establecido resulta adecuado para el análisis de estos enzimas, con la única salvedad de la existencia de un «tracking» producido durante el desarrollo por la banda más lenta con actividad enzimática. Este efecto parece debido a insuficiente desnaturalización más bien que a

un excesivo calentamiento localizado de la gelatina o a discontinuidades iónicas de la mezcla, como sugieren HEUSSEN & DOWLE (1980). Una dificultad adicional que presenta este método es que al ser el gel más denso por la presencia de gelatina copolimerizada, las muestras emigran lentamente y se hacen necesarios largos tiempos de desarrollo. La presencia de gelatina, además, impide establecer una correlación entre distancia de recorrido y logaritmo de los pesos moleculares de proteínas de calibración como en otras técnicas electroforéticas. No obstante, representa un método electroforético cómodo que hace innecesario superponer una matriz proteica al gel para evidenciar los enzimas implicados. Se manifiesta también una ligera difusión de las bandas, que varía en función del tiempo de incubación de la placa electroforética tras la renaturalización.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a G. Victoria la colaboración prestada en el aislamiento y caracterización de la cepa estudiada. La toxigenicidad de esta cepa fue determinada en colaboración con el Centro de Microbiología e Inmunología Sanitarias, Majadahonda (Madrid). Se agradece también al Centro Nacional de Referencia de *Vibrio* (Madrid) la ayuda suministrada para determinar el serotipo del microorganismo.

BIBLIOGRAFÍA

- AUNSTRUP, P. K. 1980. Proteinases. En: *Economic Microbiology*, vol. V. ROSE, A. H. (ed.). Academic Press. London.
- FINKELSTEIN, R. A.; SOBOCINSKI, P. Z.; ATTHASAMPUNNA, P. & CHARUNMETHEE, P. 1966. Pathogenesis of experimental cholera: identification of cholerae (procholerae A) by disc immunoelectrophoresis and its differentiation from cholerae mucinase. *J. Immunol.* 97: 25-33.
- HEUSSEN, C. & DOWLE, E. B. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.* 102: 196-202.
- LONG, S.; MOTHIBELI, M. A.; ROBB, F. T. & WOODS, D. R. 1981. Regulation of extracellular alkaline protease activity by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain. *J. Gen. Microbiol.* 127: 193-199.
- MAITI, M.; SUR, P. & CHATTERJEE, S. N. 1981. Polyacrylamide gel electrophoresis and infrared spectroscopy of *Vibrio* biotypes. *Can. J. Microbiol.* 27: 1.048-1.052.
- SACK, D. A. & SACK, R. B. 1975. Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y-1 adrenal cells in miniculture. *Inf. Immun.* 11: 334-336.
- SCHNEIDER, D. & PARKER, C. 1978. Isolation and characterization of protease-deficient mutants of *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* 138: 942-958.
- 1982. Purification and characterization of the mucinase of *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.* 145: 474-482.
- YOUNG, D. B. & BROADBENT, D. A. 1982. Biochemical characterization of extracellular proteases from *Vibrio cholerae*. *Inf. Immun.* 37: 875-883.