



Acta Universitaria

ISSN: 0188-6266

actauniversitaria@ugto.mx

Universidad de Guanajuato

México

Rangel Alfaro, Carlos Alberto; Mora-Montes, Héctor Manuel; Flores-Martínez, Alberto; Flores Carreón, Arturo

Aislamiento y caracterización bioquímica de la  $\alpha$ -glucosidasa II del hongo patógeno *Candida albicans*

Acta Universitaria, vol. 21, núm. 2, mayo-agosto, 2011, pp. 5-10

Universidad de Guanajuato

Guanajuato, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=41619838001>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal  
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

## Aislamiento y caracterización bioquímica de la $\alpha$ -glucosidasa II del hongo patógeno *Candida albicans*

Carlos Alberto Rangel Alfaro\*, Héctor Manuel Mora-Montes\*, Alberto Flores-Martínez\*, Arturo Flores Carreón\*

### RESUMEN

La  $\alpha$ -glucosidasa II participa en la ruta de la *N*-glicosilación de proteínas. En *Candida albicans* se ha aislado un polipéptido soluble de 47 kDa con actividad de  $\alpha$ -glucosidasa II; sin embargo, análisis bioinformáticos indican que la enzima nativa pudiera tener un peso molecular de 100 kDa. En este trabajo se estudió el efecto de inhibidores de proteasas sobre la distribución intracelular de la  $\alpha$ -glucosidasa II. Se demostró que la distribución intracelular no fue afectada significativamente, pero la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa II estuvo asociada a una proteína de 83 ó 47 kDa en ausencia o presencia de inhibidores de proteasas, respectivamente. La enzima soluble de 83 kDa se purificó por métodos convencionales y se demostró que presenta características bioquímicas similares a la enzima de 47 kDa. Estos datos confirmaron que la proteína de 83 kDa es una  $\alpha$ -glucosidasa II y sugieren que es precursora de la enzima de 47 kDa previamente descrita.

### ABSTRACT

Alpha-glucosidase II participates in *N*-linked glycosylation of proteins. A soluble 47 kDa  $\alpha$ -glucosidase II has been previously isolated from *C. albicans*; however, bioinformatics analysis indicate that native enzyme has a molecular mass of 100 kDa. In this study we assessed the effect of protease inhibitors on intracellular distribution of  $\alpha$ -glucosidase II. Despite there was not a significant change in the enzyme distribution,  $\alpha$ -glucosidase II activity was associated to a 83 or 47 kDa polypeptide in absence or presence of inhibitors, respectively. Soluble 83-kDa protein was purified by conventional methodology and its biochemical characteristics were similar to those reported for the 47 kDa enzyme. Thus, these results indicated the 83 kDa protein is an  $\alpha$ -glucosidase II and also suggested it is a precursor of the 47 kDa enzyme previously reported.

Recibido: 21 de mayo de 2010  
 Aceptado: 1 de junio de 2011

### INTRODUCCIÓN

*Candida albicans* es un hongo patógeno oportunista de humanos que en individuos inmunocompetentes forma parte de la flora normal de las mucosas del organismo. Sin embargo, en condiciones de inmunosupresión temporal o permanente puede causar infecciones sistémicas que ponen en riesgo la vida de los pacientes.

La pared celular de *C. albicans* está compuesta por una capa interna de  $\beta$ -glucanas y quitina y una externa de manoproteínas (Klis *et al.*, 2001). Estas últimas son proteínas que están modificadas ya sea con glicolípidos en el extremo C-terminal (anclas de glicosilfosfatidilinositol) y/o con oligosacáridos (Herscovics and Orlean, 1993).

Los azúcares se adicionan enzimáticamente a residuos de serina o treonina presentes a lo largo de la cadena polipeptídica (*O*-glicosilación) y/o residuos de asparagina (*N*-glicosilación) contenidos dentro de la secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina) (Kornfeld and Kornfeld, 1985). La ruta de la *N*-glicosilación inicia en el retículo endoplásmico (RE), en donde las proteínas recién sintetizadas interactúan con el complejo multiproteico oligosacariltransferasa, el cual transfiere un oligosacárido conformado por tres residuos de glucosa, nueve de manosa y dos de N-acetilglucosamina ( $Glc_3Man_9GlcNAc_2$ ) a

**Palabras clave:**  
*Candida albicans*; *N*-glicosilación;  
 $\alpha$ -glucosidasa II; procesamiento proteolítico.

**Keywords:**  
*Candida albicans*; *N*-linked glycosylation;  
 $\alpha$ -glucosidase II; proteolytic processing.

\*Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto., México. C. P. 36050, Tel.: (+52) 473-7320006 Ext. 8154; Fax: Ext. 8153; correo electrónico: floresca@ugto.mx

la asparagina presente en la secuencia consenso de la *N*-glicosilación (Herscovics, 1999a). Posteriormente, este oligosacárido es procesado por  $\alpha$ -glicosidases del RE: la glucosa más externa del Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (unida por enlace glicosídico  $\alpha$ 1,2-) es removida por la  $\alpha$ -glucosidasa I, las dos glucosas remanentes (unidas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ 1,3-) son eliminadas en dos reacciones secuenciales por la acción de la  $\alpha$ -glucosidasa II, y por último un residuo de manosa es procesado por la  $\alpha$ 1,2-manosidasa de RE dando lugar al oligosacárido Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub>. Las glicoproteínas que contienen esta *N*-glicana de ocho residuos de manosa son transportadas al aparato de Golgi, en donde glicosil hidrolasas y transferasas pueden modificar los N-oligosacáridos dando lugar a la generación de N-glicanas ricas en manosa, complejas o del tipo híbrido (Herscovics, 1999a).

Adicionalmente, la  $\alpha$ -glucosidasa II participa en un sistema de control de calidad de glicoproteínas presente en el RE, en donde los glicopéptidos mal plegados son transportados al compartimento citoplasmático y degradados por el proteosoma (Helenius and Aebi, 2004).

Estructuralmente, la  $\alpha$ -glucosidasa II de mamíferos está formada por dos subunidades:  $\alpha$  y  $\beta$  (Trombetta *et al.*, 1996; 2001). La subunidad  $\alpha$  posee la actividad catalítica pero no presenta una secuencia señal para su retención en el RE; en cambio, la subunidad  $\beta$  no tiene actividad catalítica pero si contiene en su C-terminal una secuencia señal característica de proteínas del RE (Trombetta *et al.*, 1996; 2001). En eucariontes inferiores, como *Schizosaccharomyces pombe* y *Saccharomyces cerevisiae*, se han descrito las proteínas homólogas a la subunidad  $\alpha$  y  $\beta$  (D'Alessio *et al.*, 1999; Wilkinson *et al.*, 2006) y se ha propuesto que la subunidad  $\beta$  (Gtb1) no se requiere para el procesamiento del oligosacárido Glc<sub>2</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub>, pero es esencial para la hidrólisis del Glc<sub>1</sub>Man<sub>9</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (Wilkinson *et al.*, 2006). A la fecha, en *C. albicans* solo se ha demostrado la presencia de la subunidad  $\alpha$  de la glucosidasa II. El gen *ROT2* codifica para una proteína de 100 kDa con homología significativa a la subunidad  $\alpha$  reportada en otros eucariontes (Mora-Montes *et al.*, 2007). Se ha demostrado que una mutante *rot2Δ* de *C. albicans* presenta actividad reducida de  $\alpha$ -glucosidasa, defectos en el crecimiento, en la estructuración de la pared celular, en el reconocimiento por células del sistema inmune innato y atenuación de la virulencia (Mora-Montes *et al.*, 2007). Mediante estratégicas clásicas de purificación de proteínas, se aisló, purificó y caracterizó bioquímicamente un polipéptido de 47 kDa

con actividad de  $\alpha$ -glucosidasa II (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004). La secuenciación del extremo N-terminal confirmó que forma parte del producto del gen *ROT2* (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004), por lo cual es probable que la enzima nativa haya sufrido un procesamiento proteolítico antes o durante el procesamiento de las muestras. En este trabajo se determinó el efecto de inhibidores de proteasas sobre la distribución intracelular de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa II.

## METODOLOGÍA

- I. *Microorganismo y condiciones de cultivo.* En este estudio se utilizó *C. albicans* ATCC 26555. La fase levaduriforme se propagó en medio líquido YPD (0.3 % de extracto de levadura, 1.0 % de peptona y 2 % de glucosa) durante 24 h a 28°C con agitación orbital a 120 rpm.
- II. *Obtención de las fracciones enzimáticas.* Las células se colectaron por centrifugación a 3 000 x g durante 10 min a 4 °C, se lavaron tres veces con regulador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.0 (regulador A) adicionado o no con los inhibidores de proteasas fluoruro de fenilmetsulfonilo (PMSF) 0.5 mM o pepstatina A 1  $\mu$ M y se sometieron a ruptura mecánica en un homogenizador Braun con la ayuda de perlas de vidrio de 0.5 mm de diámetro. La homogenización se realizó por 20 seg, enfriando con un flujo continuo de CO<sub>2</sub>, la muestra reposó 2 min en hielo y el procedimiento se repitió hasta completar 2 min de homogenización. Los homogenados se centrifugaron a 1 050 x g durante 10 min, los sobrenadantes se recuperaron y nuevamente se centrifugaron a 105 000 x g durante 60 min a 4 °C. La fracción soluble se recuperó, liofilizó y almacenó en alicuotas a -20 °C hasta su uso.
- III. *Purificación de la  $\alpha$ -glucosidasa.* La fracción soluble se resuspensió en 1.5 ml de regulador A, se aplicó a una columna de Sefarosa CL6B (56 cm x 2.5 cm), previamente equilibrada con regulador A, y la proteína se eluyó con el mismo regulador. Se colectaron 90 fracciones de 4 ml cada una y se estimó la proteína midiendo la absorbancia a 280 nm y actividad de  $\alpha$ -glucosidasa. Las fracciones con mayor actividad enzimática se mezclaron, se liofilizaron y la muestra se reconstituyó en regulador de fosfato de sodio 10 mM, pH 7.0 (regulador B) y se aplicó a una columna de DEAE Bio-Gel A (21 cm x 1.5 cm) equilibrada con regulador B. La columna se lavó con 80 ml de regulador B y se aplicaron 200 ml de un gradiente continuo de 0-0.5 M de NaCl en regulador B. Se colectaron fracciones de 2 ml y a cada

una se le determinó actividad de  $\alpha$ -glucosidasa y proteína a 280 nm. Las fracciones con mayor actividad enzimática se mezclaron, liofilizaron y la muestra se resuspendió en regulador B y se aplicó en una columna de Hidroxiapatita (3 x 1.5) cm equilibrada en regulador B. La muestra se eluyó primero con 20 ml de regulador B y después se emplearon 40 ml de un gradiente continuo de fosfato de sodio de 10 a 300 mM. Se colectaron fracciones de 1 ml a las cuales se les determinó proteína a 280 nm y actividad de  $\alpha$ -glucosidasa.

**IV. Cuantificación de proteínas.** La concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford (1976) y los resultados se interpolaron en una curva de calibración de albúmina sérica bovina (0-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**V. Determinación de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa.** Se utilizó el método reportado por Torre-Boscoulet y colaboradores (2004), utilizando el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glucopiranósido (MU $\alpha$ Glc). La actividad específica se expresó como nmoles de metilumbelifera min $^{-1}$  mg de proteína $^{-1}$ .

**VI. Electroforesis de proteínas.** La separación de proteínas en condiciones desnaturalizantes se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida al 10 % (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Las proteínas fueron reveladas con Azul de Coomassie. Para el caso de los zimogramas semi-desnaturalizantes se siguió el mismo procedimiento que para SDS-PAGE, omitiéndose la desnaturalización de proteínas por calor. La actividad de  $\alpha$ -glucosidasa se reveló usando el sustrato MU $\alpha$ Glc como se describió previamente (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004).

## RESULTADOS

### Efecto de inhibidores de proteasas sobre la distribución intracelular de la actividad de $\alpha$ -glucosidasa

Las células de *C. albicans* fueron sujetas a ruptura mecánica en ausencia o presencia de inhibidores de proteasas (PMSF 0.5 mM o pepstatina A 1  $\mu\text{M}$ ), y se procesaron como se indicó en la parte de Materiales y métodos. Con el objeto de separar la fracción mixta de membranas (FMM) y la fracción soluble, los homogenados crudos fueron centrifugados a 105 000  $\times$  g durante 60 min a 4 °C y se les determinó actividad enzimática. Los resultados muestran que la presencia o ausencia de inhibidores de proteasas no afectó significativamente la distribución de la  $\alpha$ -glucosidasa,

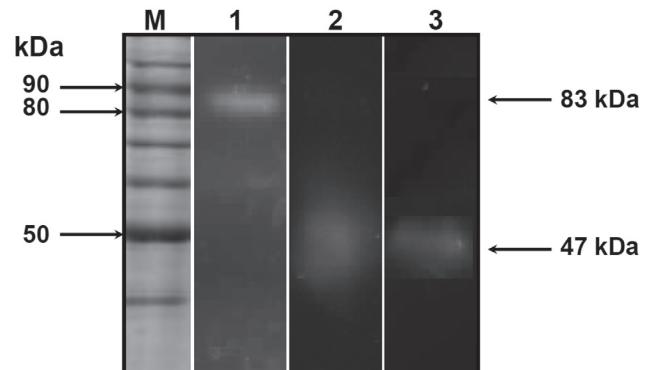
estando distribuida aproximadamente en un 65 % en la fracción soluble y el resto en la FMM (tabla 1). Sin embargo, al analizar la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa en zimogramas semidesnaturalizantes, se encontró que en la fracción soluble obtenida en ausencia de inhibidores de proteasas la actividad enzimática estuvo asociada a una proteína de 83 kDa (figura 1, carril 1), mientras que en presencia de PMSF o pepstatina A el peso molecular de la  $\alpha$ -glucosidasa fue de 47 kDa (figura 1, carriles 2 y 3).

**Tabla 1.**  
Distribución intracelular de la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa en presencia de inhibidores de proteasas.

Inhibidor de proteasas	Fracción	Proteína Total (mg)	Actividad		
			Específica*	Total**	% del total
Ninguno	FMM	58.9	0.38	22.4	36.1
	Soluble	132.3	0.30	39.7	63.9
Pepstatina A 1 $\mu\text{M}$	FMM	73.7	0.26	19.2	30.9
	Soluble	126.3	0.34	43.0	69.1
PMSF 0.5 mM	FMM	64.4	0.32	20.6	36.5
	Soluble	48.5	0.74	35.9	63.5

\*Expresada como nmoles de metilumbelifera min $^{-1}$  mg de proteína $^{-1}$ .

\*\*Expresada como nmoles de metilumbelifera min $^{-1}$  proteína total $^{-1}$ .



**Figura 1.** Zimograma semidesnaturalizante de las fracciones solubles obtenidas en presencia o ausencia de inhibidores de proteasas. Se analizaron aliquotas conteniendo 50  $\mu\text{g}$  de proteína en geles de poliacrilamida al 10 % como se menciona en la parte de Materiales y métodos. Los geles fueron incubados con el sustrato MU $\alpha$ Glc durante 30 min a 37 °C y la actividad enzimática se reveló observando los geles sobre un transiluminador de luz UV. Las muestras analizadas corresponden: 1, a la fracción soluble obtenida en ausencia de inhibidores de proteasas; 2, en presencia de PMSF 0.5 mM; 3, en presencia de pepstatina A 1  $\mu\text{M}$  y M, marcadores de peso molecular.

### Purificación de la $\alpha$ -glucosidasa soluble de 83 kDa

Debido a que el peso molecular de la  $\alpha$ -glucosidasa soluble obtenida en ausencia de inhibidores de proteasas fue mayor al reportado previamente (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004), se decidió llevar a cabo su purificación y caracterización bioquímica.

Para la purificación de la enzima, la fracción soluble fue aplicada a una columna (2.5 x 56) cm de Sefarosa CL6B y se eluyó con regulador A, colectándose fracciones de 4 mL. La enzima eluyó como un solo pico de actividad y las fracciones asociadas a ésta (usualmente 54-68) se mezclaron y liofilizaron, luego se aplicaron a una columna (1.5 x 21) cm de intercambio aniónico de DEAE Bio-Gel A y la proteína se eluyó con un gradiente continuo de 0 a 0.5 M de NaCl. Nuevamente, se obtuvo un solo pico de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa, el cual eluyó con 0.15 M de NaCl, y las fracciones con mayor actividad enzimática (usualmente 64-69) fueron recuperadas, mezcladas y liofilizadas. Como último paso de purificación se llevó a cabo una cromatografía de adsorción en una columna (1.5 cm x 3 cm) de Hidroxiapatita. Después de aplicar la muestra, la proteína se eluyó con un gradiente continuo de fosfatos de 10 a 300 mM, pH 7.0, y la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa eluyó con 130 mM de fosfatos. Las fracciones con mayor actividad (32-36) se mezclaron y utilizaron para los ensayos posteriores.

Al final de este protocolo de purificación, la actividad enzimática específica aumentó 22 veces, con una tasa de recuperación del 22.5 % (tabla 2). El análisis del perfil de proteínas de la muestra purificada mostró que, aunque la actividad enzimática no se purificó a homogeneidad, se enriqueció el péptido de 83 kDa con actividad de  $\alpha$ -glucosidasa (figura 2).

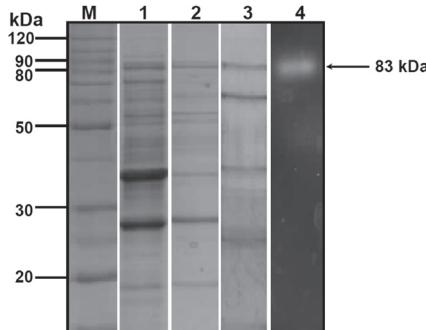
**Tabla 2.**

Purificación de la  $\alpha$ -glucosidasa soluble de *C. albicans*.

	Proteína Total (mg)	Actividad		Purificación (veces)	Recuperación (%)
		Específica*	Total**		
Fracción soluble	128.4	0.3	38.5	1.0	100
Sefarosa CL6B	54.8	0.5	27.4	1.7	71.2
DEAE Bio-Gel A	9.5	1.5	14.3	5.0	37.1
Hidroxiapatita	1.2	6.6	7.9	22.0	20.5

\*Expresada como nmoles de metilumbelifera min<sup>-1</sup> mg de proteína<sup>-1</sup>.

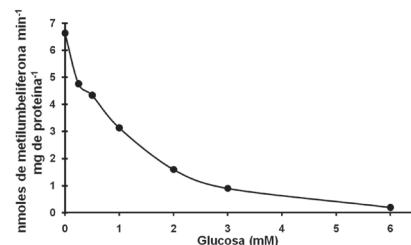
\*\*Expresada como nmoles de metilumbelifera min<sup>-1</sup> proteína total<sup>-1</sup>.



**Figura 2.** Análisis electroforético (PAGE/SDS) de las muestras obtenidas durante la purificación de la  $\alpha$ -glucosidasa y zimograma de la fracción purificada. Se analizaron alícuotas conteniendo 50  $\mu$ g de proteína en geles de poliacrilamida al 10 %, se tiñeron las proteínas con azul de Coomassie (M, 1, 2 y 3) y actividad enzimática (4) como se describe en la parte de Materiales y métodos. Carriles: M, marcadores de peso molecular; 1, Sefarosa CL6B; 2, DEAE Bio-Gel A; 3, Hidroxiapatita y 4, zimograma de la fracción purificada (Hidroxiapatita).

### Caracterización bioquímica de la enzima purificada

La enzima mostró su actividad máxima a una temperatura de 37 °C y a pH 7.4 en regulador de fostatos 50 mM (datos no mostrados). La hidrólisis del sustrato fluorogénico MU $\alpha$ Glc mostró una cinética hiperbólica con una  $K_m$  de 47  $\mu$ M. Posteriormente, se analizó el efecto de la concentración de glucosa sobre la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa, encontrándose que este azúcar inhibió la hidrólisis del MU $\alpha$ Glc en un 97 % con una concentración de glucosa 6 mM (figura 3).



**Figura 3.** Efecto de la glucosa sobre la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa purificada. La muestra de incubación contenía: enzima purificada (5  $\mu$ g de proteína), MU $\alpha$ Glc 0.04 mM y diferentes concentraciones de glucosa en un volumen final de 200  $\mu$ L de regulador A. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min. La reacción se detuvo adicionando 3.3 mL de glicina-NaOH 50 mM de pH 11 y se leyó la fluorescencia a 350 nm de excitación y 440 nm de emisión.

Debido al efecto inhibitorio de la glucosa sobre la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa purificada, se determinó si análogos de la glucosa tipo deoxiglucosa ejercían el mismo efecto. La presencia de 6 mM de 2-deoxiglucosa, 3-deoxiglucosa o manosa, no afectaron significativamente la actividad de la enzima (actividad remanente: 87.1 %, 100 % y 96.5 %, respectivamente). Sin embargo, en presencia de 6 mM de 6-desoxiglucosa, la actividad enzimática fue inhibida 81 ± 4.2 % (datos no mostrados).

El siguiente paso consistió en analizar la sensibilidad de la enzima purificada a diferentes inhibidores

de glucosidasas. Los resultados obtenidos muestran que la actividad enzimática no fue significativamente afectada por la presencia de castanospermina o australina (figura 4); sin embargo, fue parcial y totalmente inhibida por la presencia de bromoconduritol y 1-deoxinojirimicina (DNJ), respectivamente (figura 4).

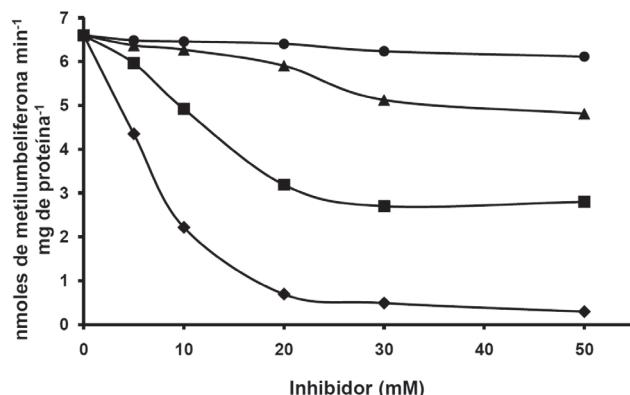


Figura 4. Efecto de inhibidores sobre la actividad de la  $\alpha$ -glucosidasa purificada. La mezcla de reacción contenía: enzima purificada (5  $\mu$ g de proteína), MU $\alpha$ Glc 0.04 mM y diferentes concentraciones de inhibidor en un volumen final de 200  $\mu$ l de regulador A. Se incubaron a 37 °C durante 30 min, se detuvo la reacción y se leyó la fluorescencia como se describió previamente. (●), castanospermina; (▲), australina; (■), bromoconduritol y (◆), deoxinojirimicina.

## DISCUSIÓN

Trabajos previos han demostrado la presencia de actividad de  $\alpha$ -glucosidasa en homogenados de *C. albicans* (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004; Mora-Montes *et al.*, 2007). El análisis de la actividad soluble de  $\alpha$ -glucosidasa obtenida en presencia de PMSF reveló una proteína de 47 kDa con actividad enzimática (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004).

En el presente trabajo realizando el mismo protocolo de ruptura celular pero en ausencia de inhibidores de proteasas, encontramos que el peso molecular de la enzima se incrementó, ya que la actividad enzimática se encontró asociada a un polipéptido de 83 kDa. La interpretación que damos a este resultado es que en presencia de PMSF o pepstatina A, una actividad proteolítica presente en los homogenados celulares lleva a cabo el procesamiento de la proteína de 83 kDa, generándose la enzima de 47 kDa. Por el contrario, en ausencia de inhibidores de proteasas, una segunda actividad proteolítica (sensible a PMSF y pepstatina A) se encarga de inactivar a la proteasa responsable del procesamiento de la  $\alpha$ -glucosidasa II. Este mecanismo contrasta con los reportados para otras glicosil hidrolasas (Jelinek-Kelly and Herscovics,

1988; Faridmoayer and Scaman, 2005; Mora-Montes *et al.*, 2006; 2008a; 2008b; 2010), en donde la adición de inhibidores de proteasas a los homogenados celulares, más que la omisión, protegen a las enzimas de procesamiento proteolítico.

El peso molecular de la enzima caracterizada en este trabajo está por debajo de los 100 kDa, peso molecular predicho para la  $\alpha$ -glucosidasa II nativa (Mora-Montes *et al.*, 2007), lo cual sugiere la presencia de por lo menos un segundo evento de procesamiento proteolítico. Permanece por determinarse si este evento de hidrólisis proteolítica se lleva a cabo *in vitro* o *in vivo*.

El protocolo de purificación utilizado fue el mismo descrito para la proteína de 47 kDa (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004), sin embargo las veces de purificación y la tasa de recuperación fueron mejores cuando se partió de un fracción soluble obtenida sin inhibidores de proteasas (22 vs 8.7 veces de purificación y tasa de recuperación de 22 % vs 13 %, en ausencia o presencia de PMSF, respectivamente), lo cual podría sugerir que la enzima de 83 kDa es más estable que la de 47 kDa.

Las características bioquímicas de la  $\alpha$ -glucosidasa de 83 kDa fueron muy similares a las reportadas para la enzima de 47 kDa: inhibición por glucosa, 6-deoxiglucosa, DNJ y parcialmente por bromoconduritol (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004), este comportamiento apoya nuestra sugerencia de que la proteína de 83 kDa es posiblemente un precursor de la proteína de 47 kDa. Adicionalmente, nuestros resultados con los análogos de glucosa confirmaron la importancia del grupo OH en la posición 2 y 3 de la glucosa para el reconocimiento del sustrato por la enzima, ya que al no estar presentes dichos residuos, la glucosa perdió su poder inhibitorio sobre la  $\alpha$ -glucosidasa purificada.

Los ensayos con inhibidores específicos de glucosidasas nos permitieron descartar la idea de que la enzima purificada sea una  $\alpha$ -glucosidasa I, en lugar de una  $\alpha$ -glucosidasa II. La enzima fue inhibida fuertemente por DNJ, inhibidor preferencial de la  $\alpha$ -glucosidasa II (Herscovics, 1999b), y fue parcialmente sensible a la presencia de bromoconduritol, también un inhibidor específico de la  $\alpha$ -glucosidasa II (Datema *et al.*, 1982; Trudel *et al.*, 1988). Adicionalmente, la actividad enzimática fue resistente a la presencia de australina y castanospermina, inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa I (Elbein, 1991). Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados para la enzima de 47 kDa, en donde la actividad de  $\alpha$ -glucosidasa fue inhibida fuertemente por DNJ, parcialmente por bromoconduritol, y débilmente por australina y castanospermina (Torre-Boscoulet *et al.*, 2004).

En conclusión, los resultados obtenidos demuestraron que la enzima soluble de 83 kDa es una  $\alpha$ -glucosidasa II precursora de la enzima de 47 kDa previamente caracterizada.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado parcialmente por la SEP-CO-NACYT: Ref. No. 2002-CO1-39528/A-1; CB-2007-1 Ref. No. 83414 y por la Universidad de Guanajuato.

## REFERENCIAS

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- D'Alessio, C., Fernandez, F., Trombetta, E. S. and Parodi, A. J. (1999). Genetic evidence for the heterodimeric structure of glucosidase II. *J Biol Chem* 274: 25899-25905.
- Datema, R., Romero, P. A., Legler, G. and Schwarz, R. T. (1982). Inhibition of formation of complex oligosaccharides by the glucosidase inhibitor bromoconduritol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 6787-6791.
- Elbein, A. D. (1991). Glycosidase inhibitors: inhibitors of N-linked oligosaccharide processing. *Faseb J* 5: 3055-3063.
- Faridmoayer, A. and Scaman, C. H. (2005). Binding residues and catalytic domain of soluble *Saccharomyces cerevisiae* processing alpha-glucosidase I. *Glycobiology* 15: 1341-1348.
- Helenius, A. and Aeby, M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73: 1019-1049.
- Herscovics, A. (1999a). Importance of glycosidases in mammalian glycoprotein biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1473: 96-107.
- Herscovics, A. (1999b). Processing glycosidases of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1426: 275-285.
- Herscovics, A. and Orlean, P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. 7: 540-550.
- Jelinek-Kelly, S. and Herscovics, A. (1988). Glycoprotein biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification of the alpha-mannosidase which removes one specific mannose residue from Man9GlcNAc. *J Biol Chem* 263: 14757-14763.
- Klis, F. M., de Groot, P. and Hellingwerf, K. (2001). Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans*. *Med Mycol* 39 Suppl 1: 1-8.
- Kornfeld, R. and Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 54: 631-664.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Mora-Montes, H. M., López-Romero, E., Zinker, S., Ponce-Noyola, P. and Flores-Carreón, A. (2006). Purification of soluble alpha1,2-mannosidase from *Candida albicans* CAI-4. *FEMS Microbiol Lett* 256: 50-56.
- Mora-Montes, H. M., Bates, S., Netea, M. G., Diaz-Jimenez, D. F., Lopez-Romero, E., Zinker, S., Ponce-Noyola, P., Kullberg, B. J., Brown, A. J., Odds, F. C., Flores-Carreón, A. and Gow, N. A. (2007). Endoplasmic reticulum alpha-glycosidases of *Candida albicans* are required for N glycosylation, cell wall integrity, and normal host-fungus interaction. *Eukaryot Cell* 6: 2184-2193.
- Mora-Montes, H. M., Bader, O., López-Romero, E., Zinker, S., Ponce-Noyola, P., Hube, B., Gow, N. A. and Flores-Carreón, A. (2008a). Kex2 protease converts the endoplasmic reticulum alpha1,2-mannosidase of *Candida albicans* into a soluble cytosolic form. *Microbiology* 154: 3782-3794.
- Mora-Montes, H. M., López-Romero, E., Zinker, S., Ponce-Noyola, P. and Flores-Carreón, A. (2008b). Conversion of alpha1,2-mannosidase E-I from *Candida albicans* to alpha1,2-mannosidase E-II by limited proteolysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93: 61-69.
- Mora-Montes, H. M., Robledo-Ortiz, C. I., González-Sánchez, L. C., López-Espaza, A., López-Romero, E. and Flores-Carreón, A. (2010) Purification and biochemical characterisation of endoplasmic reticulum alpha 1,2-mannosidase from *Sporothrix schenckii*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 79-85.
- Torre-Boscoulet, M. E., López-Romero, E., Balcázar-Orozco, R., Calvo-Méndez, C. and Flores-Carreón, A. (2004). Partial purification and biochemical characterization of a soluble alpha-glucosidase II-like activity from *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* 236: 123-128.
- Trombetta, E. S., Simons, J. F. and Helenius, A. (1996). Endoplasmic reticulum glucosidase II is composed of a catalytic subunit, conserved from yeast to mammals, and a tightly bound noncatalytic HDEL-containing subunit. *J Biol Chem* 271: 27509-27516.
- Trombetta, E. S., Fleming, K. G. and Helenius, A. (2001). Quaternary and domain structure of glycoprotein processing glucosidase II. *Biochemistry* 40: 10717-10722.
- Trudel, G. C., Herscovics, A. and Holland, P. C. (1988). Inhibition of myoblast fusion by bromoconduritol. *Biochem Cell Biol* 66: 1119-1125.
- Wilkinson, B. M., Purswani, J. and Stirling, C. J. (2006). Yeast *GTB1* encodes a subunit of glucosidase II required for glycoprotein processing in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 281: 6325-6333.