



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**DESNATURALIZACIÓN Y RENATURALIZACIÓN
DE LA ALDOLASA EN PRESENCIA Y AUSENCIA
DE SOLUTOS COMPATIBLES.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA:

BIOL. MARÍA DEL CARMEN PORTILLO TÉLLEZ.

DIRECTOR DE TESIS: Dr. SALVADOR URIBE CARVAJAL.

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE-2006



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 esta 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.

Un agradecimiento muy especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la asignación de la beca de Maestría con número de registro 189772.

Agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el financiamiento (IN216206) a una parte del proyecto y a la realización de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

■ A la UNAM gracias a sus planes de estudio de Maestría y el haber sido parte de Ciencias Biológicas y del Instituto de Fisiología Celular (I.F.C).

■ Al Dr. Salvador Uribe Carvajal, por su valiosa ayuda y paciencia para llevar a cabo este proyecto.

■ A mi comité tutorial: el Dr. Guillermo Mendoza H. y la Dra. Lina R. Riego R., por sus comentarios para mejorar el proyecto y mi aprendizaje.

■ A los profesores: Dr. Daniel A. Fernández V., Dr. Antonio Peña D., Dra. Leticia Ramírez S. y Dr. José G. Sampedro P. por sus comentarios, aportaciones y préstamos de equipo para la realización de este trabajo.

■ A mi colaboradora más pequeña, la número uno Samantha.

■ A César García por todo su apoyo.

■ Al Ing. Francisco Portillo H., por estar siempre animándome a seguir adelante.

■ A mis hermanos Francisco, Verónica y Laura.

■ A mis compañeros de laboratorio: Daniela, Gisela, Luís, Manuel, Ramón, Rodrigo, Sergio y Victoriano, por su apoyo.

■ Al técnico de laboratorio, Mto. Andrés Rojas Hernández.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado.
BSA.	Albúmina sérica bovina. (Por sus siglas en inglés de Bovine Serica Albumin)
DTT.	Ditiotreitol.
EDTA	Etilen diamino tetra acetato de sodio
FBP.	Fructosa-1,6-bisfosfato.
hsp	Proteínas de choque térmico. (Por sus siglas en inglés de heat shock protein)
$[\theta]_D$	Elipticidad molar.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ABREVIATURAS.....	5
ÍNDICE.....	6
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
ANTECEDENTES.....	11
LA ANHIDROBIOSIS.....	11
LOS SOLUTOS COMPATIBLES.....	13
LA TREHALOSA.....	14
SÍNTESIS DE TREHALOSA.....	16
HIDRÓLISIS DE TRHALOSA.....	18
MECANISMOS DE PROTECCIÓN POR TREHALOSA.....	19
LA VISCOSIDAD.....	21
ESTUDIOS EN NUESTRO LABORATORIO.....	23
EL PLEGAMIENTO PROTEICO.....	23
SÍNTESIS DE NOVO.....	25
ALDOLASA.....	25
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	31
OBJETIVO GENERAL.....	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
ELECTROFORESIS.....	32
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.....	32
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	33
FLUORESCENCIA.....	34
DICROÍSMO CÍRCULAR.....	36
ANÁLISIS DE DATOS.....	37
RESULTADOS.....	40
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	41
INACTIVACIÓN DE LA ALDOLASA.....	41
REACTIVACIÓN DE LA ALDOLASA.....	43
DICROÍSMO CÍRCULAR.....	49
FLUORESCENCIA.....	53
DISCUSIÓN.....	58
CONCLUSIONES.....	63
PERSPECTIVAS.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. “La planta de la resurrección” <i>Selaginella lepidophylla</i>	12
FIGURA 2. <i>Polypedilum vanderplanki</i>	13
FIGURA 3. Estructura de la trehalosa.....	15
FIGURA 4. La síntesis de trehalosa.....	17
FIGURA 5. Hidrólisis de trehalosa.....	19
FIGURA 6. Modelos que muestran los posibles mecanismos de protección por trehalosa.....	20
FIGURA 7. Efecto de la viscosidad de la solución de trehalosa sobre la motilidad de una macromolécula.....	22
FIGURA 8. Simulación por computadora de un esquema del escape de energía durante el plegamiento de una proteína.....	24
FIGURA 9. Estructura de la aldolasa.....	26
FIGURA 10. A) Reacción catalizada por la aldolasa.....	28
FIGURA 11. Gel de acrilamida.....	40
FIGURA 12. Efecto de la guanidina sobre la actividad de aldolasa en ausencia y presencia de trehalosa 600 mM.....	42
TABLA 1. Parámetros de la inactivación de la aldolasa por clorhidrato de guanidina en distintas concentraciones.....	43
FIGURA 13. Reactivación de la aldolasa desactivada en ausencia de trehalosa..	44
FIGURA 14. Reactivación de aldolasa previamente desactivada en guanidina 6 M.	45
FIGURA 15. Reactivación de aldolasa desactivada previamente en guanidina 6 M	46
FIGURA 16. Cinética de reactivación de aldolasa desactivada con guanidina 6 M y trehalosa 600 Mm.....	47
TABLA 2. Parámetros cinéticos de la reactivación de la aldolasa por dilución 1:100.....	48
FIGURA 17. Espectros de dicroísmo circular de la aldolasa en el ultravioleta lejano	50
FIGURA 18. Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano.....	52
FIGURA 19. Espectros de fluorescencia de aldolasa en distintas concentraciones de guanidina.....	54
FIGURA 20. Espectros de fluorescencia de aldolasa con trehalosa en distintas concentraciones de guanidina.....	55
FIGURA 21. Desnaturalización de aldolasa en distintas concentraciones de guanidina con y sin trehalosa 600 mM.....	56
TABLA 3. Parámetros de la desnaturalización de la aldolasa por distintas concentraciones de clorhidrato de guanidina.....	57

RESUMEN

Los anhidrobiontes son organismos que utilizan solutos compatibles para sobrevivir a la desecación. Los solutos compatibles muestran gran potencial para usarlos como estabilizadores de proteínas. En este estudio se ha utilizado el soluto compatible trehalosa para incrementar la estabilidad durante el proceso del plegamiento-desplegamiento de la aldolasa de músculo de conejo provocado por diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina. La aldolasa es una enzima homotetramérica que participa en las vías glucolítica y gluconeogénica. Se determinó actividad y la preservación de su estructura secundaria y terciaria. Se llevaron a cabo ensayos de fluorescencia y espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano y lejano. La aldolasa se desactivó y desnaturizó con clorhidrato de guanidina. A bajas concentraciones de guanidina, la trehalosa protegió a la enzima y la concentración media de guanidina para llegar al estado desnaturizado de la proteína fue más alta. Con 6 M de guanidina la enzima se desnaturizó y se desactivó completamente. Para renaturalizarla se diluyó 100 veces. Se adicionó trehalosa tanto al medio de desnaturización como al de renaturalización. Cuando se llevaron a cabo los ensayos de reactivación, se observó que sólo la enzima desnaturizada con trehalosa se reactivó. Por otro lado, la presencia de trehalosa en el medio de renaturalización hizo más lento el proceso. Estos datos son compatibles con una inhibición de la vibración intramolecular de las proteínas mediada por trehalosa, lo que modificó los procesos tanto de desnaturización como de renaturalización.

INTRODUCCIÓN

En nuestro mundo encontramos seres vivos con características especiales, que les permiten sobrevivir en situaciones adversas. Algunos organismos sobreviven al calor extremo, así como otros sobreviven a la desecación, al congelamiento, a cambios de pH o al exceso de radicales libres (Welsh, 2000). Para sobrevivir estos organismos preservan la actividad y estructura de sus membranas y proteínas mediante la acumulación de solutos compatibles (Allison y cols., 1999).

Entre los solutos compatibles se encuentran disacáridos como la sacarosa, la trehalosa y la maltosa, aminoácidos como la prolina, derivados de aminoácidos como la glicil-prolina y polialcoholes como el manitol, el sorbitol y el glicerol (Puhlev y cols., 2001). Durante el estrés en los organismos, los solutos compatibles llegan a acumularse en un rango de concentración milimolar. Antiguamente se les llamó solutos compatibles porque se pensaba que protegían a los organismos contra el estrés sin interferir con su metabolismo. Sin embargo, es muy probable que si exista algún tipo de interferencia porque cuando el estrés desaparece, el soluto compatible se debe eliminar para que el organismo reanude su actividad normal (Sleator y Hill, 2002; Welsh, 2000).

En organismos como las levaduras, los insectos y algunas plantas, la trehalosa es uno de los solutos compatibles que más se utiliza para proteger la estructura proteica y la viabilidad celular. La trehalosa es un disacárido de glucosa (α -D-glucopiranosil α -D-glucopiranosido) (Lins y cols., 2004).

Dentro de las características de las estructuras moleculares de un sistema viviente está la capacidad de ensamblarse por sí mismas con precisión y fidelidad. El plegamiento de las proteínas a su estructura tridimensional compacta es fundamental y universal (Dobson, 2003, Pan y Smith, 2003).

Las proteínas pueden llevar a cabo sus funciones sólo si han adoptado su estructura específica y estable (nativa). (Wedemeyer y Scheraga, 2001). La estabilidad proteica depende del ambiente físico y químico, del pH y de la temperatura (Hammarström y Johnson, 2005).

Entre los métodos que hay para incrementar la estabilidad de las proteínas está la adición de solutos compatibles, que lleva al decremento del daño por estrés y estabiliza la estructura de las proteínas durante el congelamiento, la desecación o el calor. También, los solutos compatibles, tiene la capacidad de suprimir la agregación de las proteínas desnaturalizadas (Melo y cols., 2003).

En esta tesis se propone como modelo para estudiar la estabilidad proteica a la aldolasa de músculo de conejo. La aldolasa es una enzima glucolítica y gluconeogénica (Zhang, 1996). Es un homotetrámero y ha sido utilizada como modelo en el plegamiento de proteínas ya que su desnaturalización por agentes caotrópicos (clorhidrato de guanidina 6M) es reversible cuando se elimina al agente caotrópico por medio de diálisis (Pan y Smith, 2003). La aldolasa se ha desnaturalizado por pH, urea y vuelto a renaturalizar. Sus subunidades pueden ser disociadas reversiblemente, y son activas (Stellwagen y Schachman, 1962; Deal y cols., 1963; Chan y Mawer, 1972; Chan y cols. 1973, Rudolph y cols., 1976).

La aldolasa se desactivó y desnaturalizó con clorhidrato de guanidina. Este proceso se siguió mediante experimentos al equilibrio y con cinéticas. Para renaturalizar a la aldolasa por dilución rápida se le agregó trehalosa tanto al medio de desnaturalización como al de renaturalización. Así se evaluó la estabilidad de la enzima en presencia del soluto compatible. En este sistema se determinó la estructura cuaternaria, terciaria y secundaria, con ensayos de actividad, ensayos de fluorescencia y espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano y lejano.

ANTECEDENTES

LA ANHIDROBIOSIS

Los anhidrobiontes son organismos que sobreviven a la desecación. Para sobrevivir necesitan preservar tanto su actividad, como la estructura de sus membranas y proteínas. Cuando estos organismos son sometidos a condiciones adversas como la desecación, la preservación de sus estructuras se logra mediante la acumulación de solutos compatibles (Allison y cols., 1999).

Los anhidrobiontes usan diferentes carbohidratos o polialcoholes como agentes protectores contra la desecación. Algunos solutos compatibles son la trehalosa, la sacarosa, la lactosa, la maltosa, el inositol y el glicerol (Puhlev y cols., 2001). La trehalosa se ha encontrado en bacterias, levaduras, hongos, artemia, nemátodos, rotíferos, tardígrados, insectos y plantas (Watanabe y cols., 2003; Crowe y cols., 1992).

Un ejemplo de un organismo anhidrobionte es la “planta de la resurrección”, *Selaginella lepydophylla*, que es nativa de México (Van Dijck y cols., 2002), la cual produce grandes cantidades de trehalosa. Esta planta puede sobrevivir una dramática desecación y recobrar completamente su actividad durante la rehidratación, eliminando la trehalosa (Fig. 1) (Singer y Lindquist, 1998).

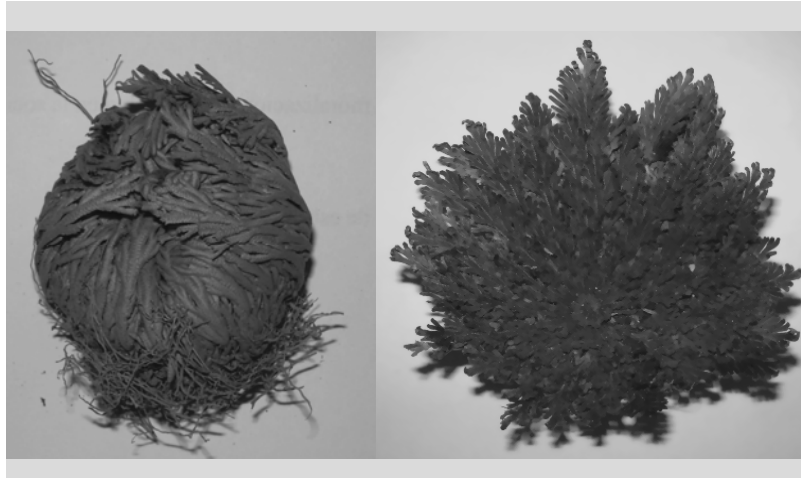


FIGURA 1. “La planta de la resurrección” *Selaginella lepidophylla*.

En el panel izquierdo se muestra la planta durante su período de desecación. En el panel derecho la observamos después de la rehidratación.

Otro ejemplo de este tipo de organismos es la larva de un quironómido (mosquito) africano, *Polypedilum vanderplanki*. Completamente deshidratada esta larva puede sobrevivir a temperaturas desde -270 hasta 106 °C. Durante la anhidrobiosis acumula grandes cantidades de trehalosa, llegando a acumularse hasta el 20 % de su peso seco. Cuando las condiciones son óptimas, la larva se rehidrata y elimina paulatinamente la trehalosa recuperando sus funciones biológicas (Fig. 2) (Watanabe y cols, 2002, 2003).

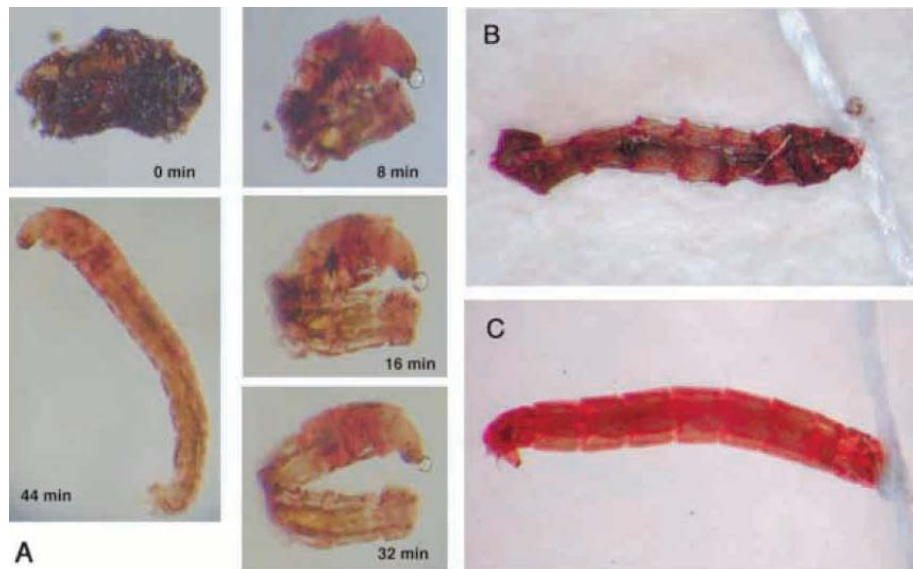


FIGURA 2. *Polypedilum vanderplanki*. Recuperación de la criptobiosis. (A) Larva recuperándose de la criptobiosis a 0, 8, 16, 32 y 44 minutos después de la rehidratación. (B) Larva criptobiótica decapitada. (C) Larva en el segundo día después de la rehidratación que ha recuperado la cabeza (tomado de: Watanabe y cols. 2002).

LOS SOLUTOS COMPATIBLES

Los organismos procariontes y eucariontes ubicados en todos los niveles de la escala filogenética han desarrollado diversas estrategias para sobrevivir al estrés (Voit, 2003; Richard y Foster, 2003; Meaux y Mitchell-Olds, 2003). Una es la síntesis de proteínas de choque térmico (heat shock proteins o hsp) que tienen actividad de chaperoninas y ayudan a mantener o a recuperar la estructura nativa

de diversas enzimas durante y después del estrés, respectivamente (Morano y cols., 1998; Gross y Watson, 1998). Otra estrategia de supervivencia es la acumulación de altas concentraciones de solutos de bajo peso molecular que protegen la estructura y actividad proteicas (Voit , 2003; Reinders y cols., 1997). Un soluto compatible debe ser una molécula pequeña, que pueda ser sintetizada rápidamente y acumulada en el citoplasma en respuesta a la agresión del medio y debe ser eliminada en cuanto desaparezca el estrés (Sleator y Hill, 2002). Los solutos compatibles, llamados así porque aún a grandes concentraciones no interfieren con el funcionamiento óptimo de las moléculas a las que protegen, pueden ejercer su protección a través de diversos mecanismos que aún se encuentran bajo estudio (Sleator y Hill, 2002; Vreeland, 1987; Singer y Lindquist, 1998). Los solutos compatibles protegen a la célula contra diferentes tipos de estrés como el calor, la desecación y el frío (Welsh, 2000).

Cuando se remueve el agua, hay disminución de puentes de hidrógeno de la proteína. Esto se puede apreciar en la lisozima, la cual mantiene su estado nativo con la trehalosa durante la desecación, gracias a los puentes de hidrógeno entre el azúcar y la proteína que toman lugar cuando se pierde el agua (Allison y cols., 1999; Carpenter y Crowe, 1989). Incluso se ha propuesto que el desplegamiento de la proteína es mecánicamente inhibido por la captura de la proteína en una matriz amorfa de trehalosa (glass) (Allison y cols., 1999; Franks y cols.,1991).

La presencia de altas concentraciones de solutos compatibles tiende a inhibir la desnaturalización térmica de las proteínas (Welsh, 2000). Es por esto que los solutos compatibles han sido aplicados a la estabilización de proteínas purificadas. Los solutos compatibles protegen durante la desecación (Allison y cols., 1999; Crowe y cols., 1998) o bien durante la desnaturalización por agentes caotrópicos como la guanidina (Melo y cols., 2003).

LA TREHALOSA

La trehalosa (Fig. 3) está entre los azúcares menos reactivos y su estabilidad es el resultado de la baja energía de su unión glucosídica α 1,1 (Lins y cols., 2004). Su importancia biotecnológica radica en su efectividad para estabilizar estructuras de membrana, preparaciones farmacéuticas y órganos para trasplante. Disminuye el daño por bajas temperaturas y estabiliza la estructura de las proteínas durante el congelamiento, desecación y calor (Allison y cols., 1999; Crowe y cols., 1998). También tiene la capacidad de suprimir la agregación de proteínas desnaturalizadas *in vitro* (Melo y cols, 2003).

En la naturaleza la trehalosa está presente en la hemolinfa de los insectos, en algunas plantas desérticas, y en algunos organismos como tardígrados, levaduras, algas y hongos, capaces de sobrevivir a la desecación y a altas temperaturas (Lins y cols., 2004).

Por otro lado, se ha observado que una vez que la condición de estrés ha pasado y la célula reanuda su metabolismo normal, la presencia de trehalosa (o de otros solutos compatibles) es dañina y puede resultar en muerte celular. Por ejemplo, la eliminación del gen de la trehalasa en levaduras resulta en células más resistentes al estrés que luego son incapaces de reproducirse. Este fenómeno ha llevado a proponer que, así como la trehalosa es necesaria para evitar la desnaturalización proteica, también evita que las proteínas parcialmente desnaturalizadas se renaturalicen (Singer y Lindquist, 1998).

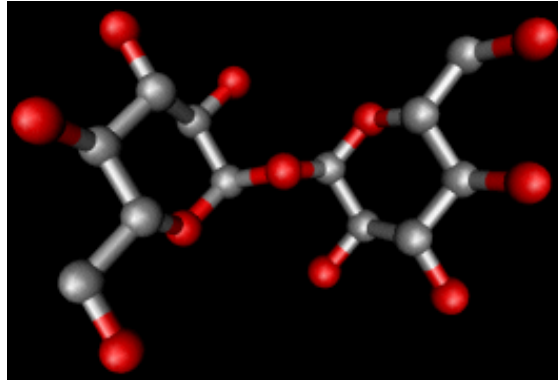


FIGURA 3. Estructura de la trehalosa. α -D-glucopiranosil- α -D-Glucopiranosido. Se observa la unión glucosídica entre el carbono 1 de ambas moléculas de glucosa para formar el disacárido no reductor (Glc α 1 \leftrightarrow 1 α Glc). En color rojo observamos los oxígenos unidos a los carbonos en color gris.

SÍNTESIS DE TREHALOSA

La trehalosa es sintetizada por un complejo multienzimático localizado en el citoplasma denominado trehalosa-6-fosfato sintetasa/fosfatasa (630~800 kDa) presente constitutivamente (Bell y cols., 1992). Este complejo está constituido por las enzimas trehalosa-6-P sintetasa (Tps1p) y trehalosa-6-P fosfatasa (Tps2p), y por dos subunidades (Tps3p y Tsl1p) que regulan a ambas enzimas (Reinders y cols., 1997). La trehalosa se sintetiza en dos pasos consecutivos (Figura 4). En la primera reacción catalizada por Tps1p se condensa la glucosa-6-fosfato con la UDP-glucosa para formar trehalosa-6-fosfato (Figura 4a). En la segunda reacción catalizada por Tps2p se lleva a cabo la hidrólisis del grupo fosfato para formar trehalosa (Figura 4b). La síntesis de trehalosa está regulada por fosforilación de las subunidades Tps3p y Tsl1p por proteína cinasas dependientes de AMPc. Las enzimas trehalosa 6-P sintetasa y -fosfatasa se activan por temperatura en el choque térmico. A 40°C las enzimas son tres veces más activas que a 30°C (Neves y Francois, 1992) asimismo, se induce la expresión de los genes *TPS1*, *TPS2*, *TPS3* y *TSL1* (Winderickx y cols., 1996, Parrou y cols., 1997). La inducción se lleva a cabo por la unión de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p a la

secuencia CCCCT (denominada STRE, Stress Responsive Element) ubicada en los promotores de dichos genes (Winderickx y cols., 1996, Parrou y cols., 1997).

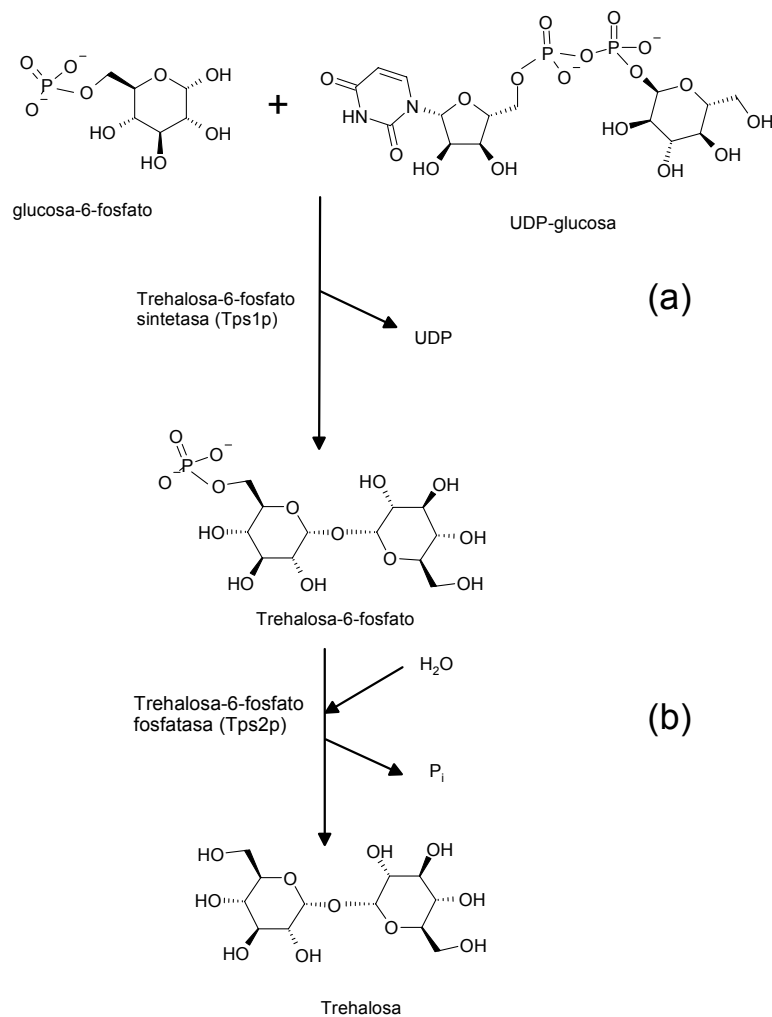


FIGURA 4. La síntesis de trehalosa. Se lleva a cabo en el complejo TPS (trehalosa-6-P sintetasa/fosfatasa) en dos reacciones consecutivas. En la primera reacción (a), catalizada por Tps1p, se lleva a cabo la condensación de la glucosa-6-fosfato con UDP-glucosa para formar trehalosa-6-fosfato. En la segunda reacción (b), catalizada por Tps2p, se lleva a cabo la hidrólisis de la trehalosa-6-P liberando trehalosa y P_i (Tomado de: Sampedro, 2003).

HIDRÓLISIS DE TREHALOSA

La eliminación de la trehalosa del citoplasma la lleva a cabo principalmente la enzima trehalasa neutral (Nth1p) (Nwaka y Holzer, 1998). Nth1p cataliza la hidrólisis de la trehalosa a dos moléculas de glucosa a un pH óptimo de 7.0 (Nwaka y Holzer, 1998; Figura 5). La actividad de esta enzima está regulada por fosforilación por proteína cinasas dependientes de AMPc (Zahringer y cols, 1998). Esta enzima se encuentra presente constitutivamente, no obstante, su síntesis aumenta durante el estrés (De Virgilio y cols., 1994, Zahringer y cols, 1997). En las células mutantes en *NTH1*, la acumulación de trehalosa aumenta al doble en el choque térmico (Cansado y cols., 1998). No obstante, después del periodo de estrés estas células son incapaces de eliminar la trehalosa del citoplasma y no pueden reanudar su metabolismo y multiplicarse (De Virgilio y cols., 1994, Wera y cols., 1999). La trehalasa neutra 2 (Nth2p) se ubica en el citoplasma y responde al estrés de manera similar a Nth1p aunque su función en la célula aún se desconoce, ya que la inactivación del gene *NTH2* no tiene un efecto aparente en la hidrólisis de trehalosa (Nwaka y Holzer, 1998). La trehalasa ácida (Ath1p, actividad máxima a pH 4.5) está involucrada en la utilización de trehalosa como fuente de carbono (Nwaka y Holzer, 1998). Ath1p se localiza en la vacuola y no responde al estrés (Alizadeh y Klionsky, 1996). Las mutantes en *ATH1* son incapaces de utilizar trehalosa como fuente de carbono.

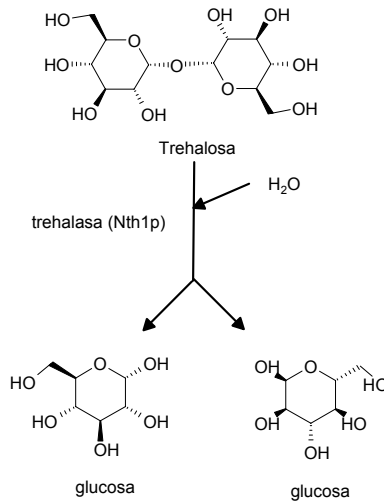


FIGURA 5. Hidrólisis de trehalosa. La trehalosa acumulada en el citoplasma en la fase estacionaria y durante el periodo de estrés es hidrolizada a dos moléculas de glucosa por la enzima trehalasa neutral (Nth1p). Esta reacción también es llevada a cabo en el citoplasma por la trehalasa neutra 2 (Nth2p) y en la vacuola por la trehalasa ácida (Ath1p) (Tomado de: Sampedro, 2003).

MECANISMOS DE PROTECCIÓN POR TREHALOSA

La función biológica de las proteínas depende de su estructura tridimensional, la cual es determinada por agua. Si el agua es removida de la estructura nativa, se pierde la función (Allison y cols., 1999).

Se ha propuesto que la preservación de la estructura proteica es promovida por la trehalosa (u otros solutos compatibles) a través de la preservación de los puentes de hidrógeno con residuos polares. Es decir, hay una interacción directa entre las moléculas de trehalosa y la proteína (Fig 6). Esta es la hipótesis de reemplazamiento de agua o de asociación preferencial (Carpenter y Crowe, 1989).

Con altas concentraciones de trehalosa se forma una estructura vítrea amorfa (glass), que probablemente es necesaria para estabilizar una conformación particular de las estructuras deshidratadas. Esta es la hipótesis del atrapamiento mecánico (Ramírez-Silva y cols., 2003; Crowe y cols., 2001, 1998; Kamiyana, 1999, Carpenter y Crowe, 1989.)

También se ha propuesto que la trehalosa promueve la hidratación preferencial de proteínas (Timasheff, 1992; Belton y Gil, 1994). Es decir, una capa de agua es atrapada por el azúcar y permanece alrededor de la proteína (Xiu y Timasheff, 1997).

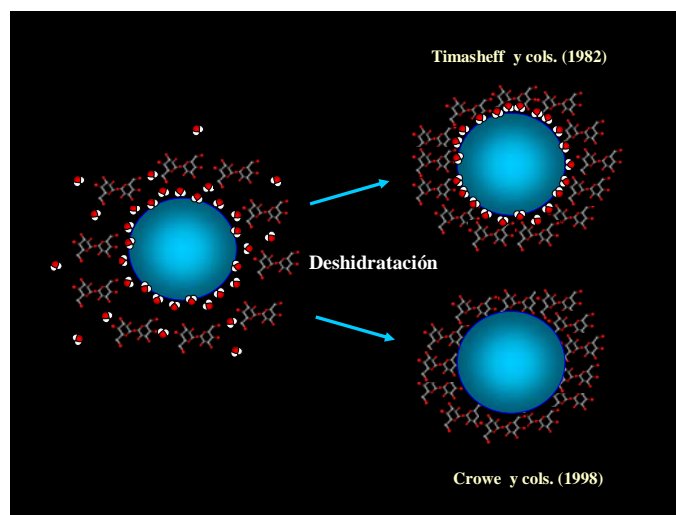


FIGURA 6. Modelos que muestran los posibles mecanismos de protección por trehalosa. Después de la deshidratación Timasheff (1992) propone que la estabilización se debe a una hidratación preferencial de la enzima nativa, donde se acumula una capa de agua y alrededor de ella la trehalosa. Crowe (1998) propone que el estado nativo se protege por la unión preferencial de la trehalosa por medio de puentes de hidrógeno entre el azúcar y la proteína, perdiéndose el agua.

LA VISCOSIDAD

Un mecanismo más general de protección puede ser la viscosidad, ya que la gran acumulación de solutos compatibles observada en el citoplasma de una célula sometida a estrés incrementa la viscosidad haciendo más rígidas a las proteínas, favoreciendo su conformación más compacta y más estable (Kramers, 1940; Jacob y Schmid, 1999; Sampedro y Uribe, 2002). Así se contrarresta la alta vibración de la proteína involucrada en la termoinactivación (Jacob y cols., 1999). Naturalmente, en ausencia de estrés la rigidez de la proteína podría interferir con la función, lo que explica porqué la célula elimina rápidamente los solutos compatibles en cuanto termina el estrés (Sleator y Hill, 2002; Vreeland, 1987).

La posible relación entre la viscosidad y los movimientos de las enzimas ha sido descrita por la teoría de Kramers (Jacob y Schmid, 1999). Esta teoría describe los efectos de las propiedades del solvente sobre el comportamiento de las reacciones proteicas que requieren de movimientos difusionales de dominios (Fig. 7. Sampedro y Uribe, 2004). En una reacción que fluye desde el estado S a través del estado activado X hasta el producto P, ($S \rightarrow X \rightarrow P$), la velocidad a la que se alcanza el estado activado X y aparece P disminuye al aumentar la fricción de la proteína con el solvente (Jacob y Schmid 1999; Sampedro y cols, 2002).

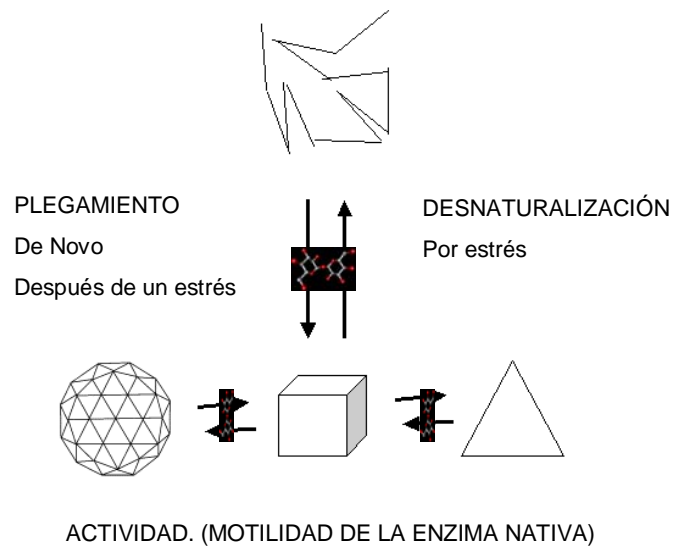


FIGURA 7. Efecto de la viscosidad de la solución de trehalosa sobre la motilidad de una macromolécula. Se estabilizan las estructuras de la proteína inhibiendo las vibraciones intra-moleculares (motilidad) y las transiciones conformacionales del estado nativo al desnaturalizado y viceversa (modificado de: Sampedro y Uribe, 2004).

ESTUDIOS EN NUESTRO LABORATORIO

En nuestro laboratorio se ha estudiado la interacción enzima-trehalosa, usando la ATPasa de protones de *Kluyveromyces lactis*. Se evaluó su estabilidad durante la deshidratación con la adición de diferentes carbohidratos y con la trehalosa se obtuvo un grado máximo de estabilización (Sampedro y cols., 1998). También se vio la estabilización de la ATPasa durante su inactivación térmica, donde se observó una protección total de 35 a 40 °C con trehalosa 600 mM (Sampedro y cols., 2001). Asimismo se evaluó el efecto de la viscosidad promovida por la trehalosa a distintas temperaturas sobre la actividad de la enzima. Se propuso que la viscosidad del medio aumenta por la trehalosa y evita los movimientos de las proteínas que resultan en cambios estructurales (Sampedro y cols., 2002; Sampedro y Uribe, 2004).

EL PLEGAMIENTO PROTEICO

Una de las características definitivas de un sistema viviente es la capacidad de sus estructuras moleculares de ensamblarse por sí mismas con precisión y fidelidad. El plegamiento de las proteínas a su estructura tridimensional compacta es el ejemplo fundamental y universal de ensamble biológico (Dobson, 2003).

Los modelos actuales dicen que los perfiles de energía libre que siguen las proteínas al ensamblarse en sus formas plegada y desplegada tienen la apariencia de embudos que guían la búsqueda del estado nativo (Fig 8). Estos perfiles de energía llevan a detectar poblaciones de intermediarios y definir si los caminos de plegamiento pueden ser determinados a partir del camino de desplegamiento (Pan y Smith, 2003). El mecanismo por el cual una cadena polipeptídica se pliega a su estructura tridimensional específica es aún motivo de discusión. En condiciones

fisiológicas los estados nativos siempre corresponden a las estructuras termodinámicamente más estables (Fig. 8. Dobson, 2003).

El proceso de plegamiento no involucra una serie de pasos específicos entre sus estados. La cadena polipeptídica es capaz de buscar la estructura de más baja energía por un proceso de ensayo y error, más aún si el perfil de energía presenta sólo un pequeño número de conformaciones posibles durante su transición desde un estado desordenado a una estructura nativa (Dobson, 2003).

Analizando estados de transición hacia el plegamiento, se identifican regiones críticas de los perfiles de energía a través de los cuales las moléculas deben pasar para llegar al estado nativo (Fig 8. Dobson, 2003).

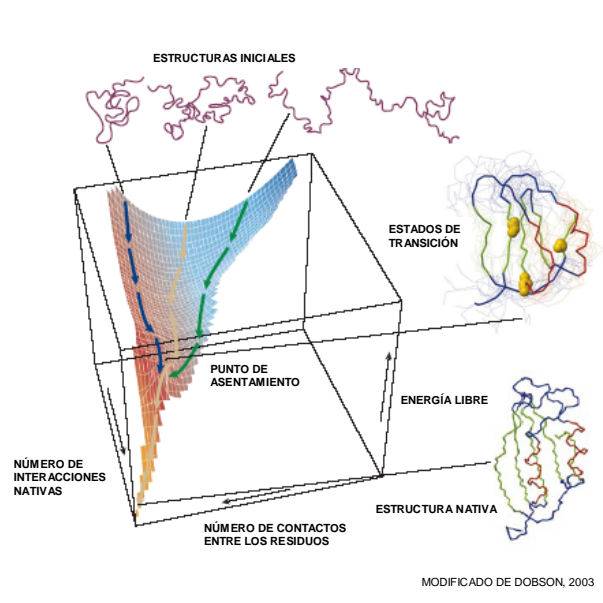


FIGURA 8. Simulación por computadora de un esquema del escape de energía durante el plegamiento de una proteína. Es un túnel que va de múltiples conformaciones desnaturalizadas a la única estructura nativa. Hay una región crítica que es el punto de asentamiento, un estado de transición como una barrera que se debe cruzar hacia el estado nativo (Modificado de: Dobson, 2003).

SÍNTESIS DE NOVO.

Todas las proteínas son sintetizadas en los ribosomas usando la información genética codificada en el ARNm. En algunos casos el plegamiento *in vivo* es cotraduccional y se inicia durante la síntesis de la proteína, así la cadena naciente es plegada junto al ribosoma. Otras proteínas se pliegan en el citoplasma, después de salir completamente del ribosoma. Otras viajan a compartimentos específicos tales como la mitocondria o el retículo donde se pliegan. También hay moléculas denominadas chaperonas que interactúan con las cadenas nacientes y controlan el proceso de plegamiento (Dobson, 2003).

La pérdida del correcto plegamiento de la proteína, ya sea por una mutación o algún estrés, puede alterar funciones específicas de la célula. Cuando la proteína mal plegada permanece en el organismo llega a provocar su muerte (Dobson, 2003, Radford y Dobson, 1999). Algunas de estas enfermedades, mortales en el humano son: fibrosis quística, algunos tipos de cáncer, Alzheimer, Parkinson, encefalopatía espongiiforme, diabetes tipo II y Kuru, entre otros (Dobson, 2001 y 2003; Horwich, 2002 ; Thomas y cols., 1995.)

ALDOLASA

La enzima que se usó para este estudio es la aldolasa de músculo de conejo (fructosa – 1,6 – bisfosfatasa), que participa tanto en la glucólisis como en la gluconeogénesis (Fig. 9). Fue descubierta por Mayerhof y Lohmann en 1934. La isoforma A es un homotetrámero ($M_r=157$ kDa), que en cada subunidad tiene 363 residuos. Las subunidades forman un barril- α/β paralelo (Fig. 9) (Pan y Smith, 2003). La aldolasa tiene un punto isoeléctrico de 8.4 (<http://www.rcsb.org/pdb>)

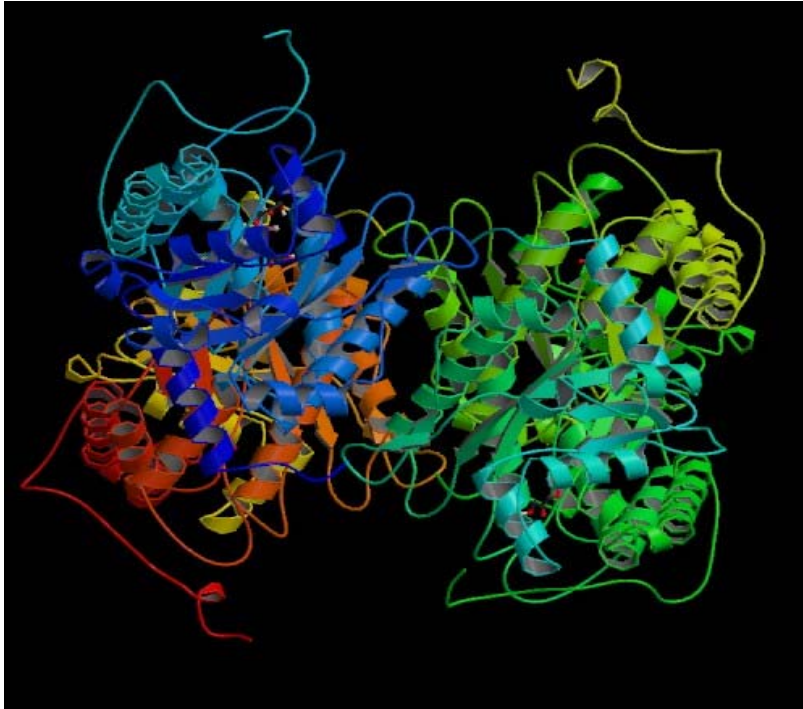


FIGURA 9. Estructura de la aldolasa. Cristal con una resolución de 2.3 Å. (Choi y cols, 1999). <http://www.rcsb.org/pdb> : Aldolase from rabbit muscle. P00883. Se ven los cuatro barriles α/β .

La aldolasa cataliza una reacción reversible en la cual una molécula de fructosa-1,6-bisfosfato (FBP) se rompe para formar dos triosas fosfato, la dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído-3-fosfato. También cataliza la reacción inversa, durante la gluconeogénesis, en donde hay una condensación aldólica (Zhang y Smith, 1996).

En la reacción de la glucólisis un residuo de lisina (Lys) en el sitio activo ataca a la cetosa del sustrato FBP. Se forma una carbinolamina tetrahédrica bipolar con el campo funcional del grupo ceto (Fig. 10B, 1). La carbinolamina es deshidratada a la forma imina protonada de la base de Schiff (Fig. 10B, 2). La eliminación del protón del hidroxil del C₄ inicia el rearrreglo resultante de la unión

de los C3-C4 del sustrato y la formación de la enamina en el sitio activo (Fig. 10B, 3) (St-Jean y cols., 2005).

Junto a la base de Schiff está la Lys 229 que participa potencialmente en la catálisis. Este residuo puede mediar la transferencia de protones ácido-base, estabilizando las cargas. El Glu 187, adyacente a Lys 229, también participa en la estabilización de las cargas de la base de Schiff. Otros residuos como Asp 33 y Lys 146 tienen también un papel importante en la catálisis (St-Jean y cols., 2005).

Las tres formas de la fructosa - 1,6 - bisfosfatasa aldolasa encontrada en mamíferos codificada por los genes Aldolasa A, B y C respectivamente, son similares en actividad enzimática, y difieren en su afinidad por los dos sustratos fisiológicos: fructosa -1,6- bisfosfato y fructosa -1- fosfato. La aldolasa B está involucrada en la vía de utilización de fructosa exógena en el hígado derivada de la dieta y las mutaciones en este gen causan intolerancia a la fructosa, un desorden hereditario. La aldolasa A es esencial en todos los tejidos de mamíferos, cataliza la segmentación reversible de fructosa-1,6-bifosfato en la glicólisis. La aldolasa C es expresada predominantemente en cerebro (Buono y cols., 2001; Kajita y cols., 2001).

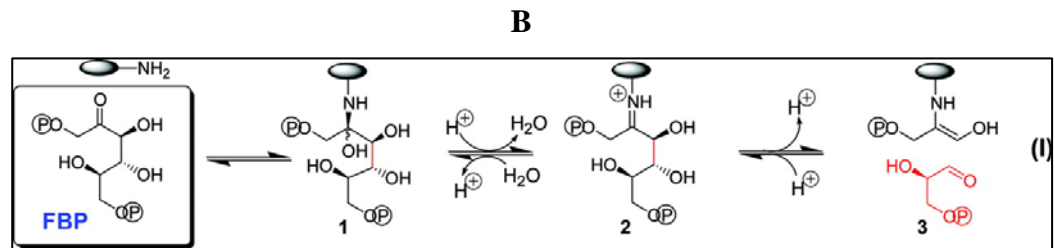
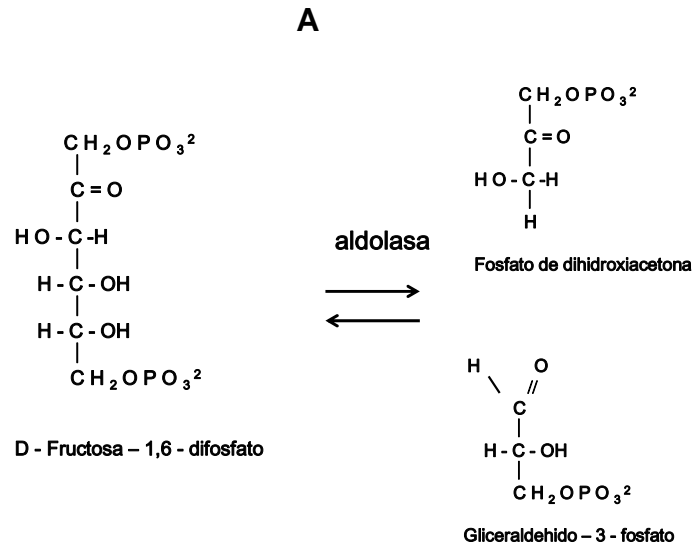


FIGURA 10. A) Reacción catalizada por la aldolasa, de fructosa - 1,6 - bisfosfato a dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehido - 3 - fosfato. B) Intermediarios de los mecanismos catalíticos en aldolasa. En la reacción de la glucólisis un residuo de Lis 229 en el sitio activo ataca a la cetosa del sustrato FBP. Se forma una carbinolamina tetrahédrica bipolar con el campo funcional del grupo ceto (**1**). La carbinolamina es deshidratada a la forma imina protonada de la base de Schiff (**2**). La eliminación del protón del hidroxil del C₄ inicia el rearrreglo resultante de la unión de los C₃-C₄ del sustrato y la formación de la enamina en el sitio activo (**3**) (St-Jean, 2005).

Esta enzima se ha estudiado desde décadas atrás. Se han implementado métodos para la determinación de la aldolasa en tejidos animales. Se puede cuantificar y medir su actividad, con métodos como el de Hidrazina - Hidrazona (Sibley y Lehninger, 1949) y un método enzimático acoplado a la reducción del

NADPH por triosa fosfato isomerasa (TPI) y glicerol deshidrogenasa (Wu y Racker, 1959).

La aldolasa ha sido inactivada *in vitro* por cloruro de guanidina (Tanford y cols., 1966; Rudolph y cols, 1977). También se ha desnaturalizado por ácido, llevándola hasta un pH de 2.3, y al transferirla a un pH de 7.6 se vuelve a renaturalizar. (Rudolph y cols, 1976).

Anteriormente se ha mostrado que la aldolasa se puede dissociar en sus unidades al tratarla con urea. En sus subunidades tiene actividad (Chan y cols., 1967 y 1970), al remover el desnaturalizante se recupera la actividad y concomitantemente la formación de la molécula tetramérica, indistinguible de la enzima nativa (Chan y Mawer, 1972; Chan y cols., 1973). La aldolasa ha sido también dissociada en subunidades las cuales se pegaron a una matriz. Se mostró que éstas tenían un 27 % de actividad con respecto al tetrámero de la aldolasa nativa (Chan y Mawer, 1972).

En un reporte mas reciente se observó que la estructura cuaternaria de la aldolasa tiene diferentes intermediarios de plegamiento y despleamiento (Pan y Smith, 2003). Se sugirió que las vías de desnaturalización y renaturalización no son iguales. La renaturalización de aldolasa de músculo de conejo se estudió a diferentes tiempos. Esta renaturalización se logró mediante diálisis para eliminar el clorhidrato de guanidina. Si la guanidina se elimina por dilución rápida, entonces la proteína desnaturalizada se agrega, impidiendo el estudio de la cinética de inactivación-reactivación y desnaturalización-renaturalización. Finalmente se observó que durante el proceso de plegamiento hacia la estructura nativa de la enzima se involucran tres dominios y dos intermediarios en un modelo modular, que comienza con un colapso a un estado compacto, siguiendo un plegamiento secuencial y cooperativo (Pan y Smith, 2003).

Adicionalmente, se ha demostrado que esta enzima tiene ocho cisteínas que se pueden combinar con N-etilmaleimida (NEM) o con SL-NEM (Spin Labeled) inactivando a la aldolasa. En contraste, en presencia del sustrato o de un inhibidor competitivo cuatro Cys son protegidas y se evita la inactivación. Cuando la enzima se marca con SL-NEM la desnaturalización puede seguirse por resonancia paramagnética electrónica (Uribe y cols., 1990; Hopgood y cols., 1988).

HIPÓTESIS


Si al desactivar la aldolasa se le protege con solutos compatibles, entonces la remoción del agente desnaturizante permitirá la reactivación de la enzima.


OBJETIVOS


OBJETIVO GENERAL


Estudiar los cambios de actividad y estructura de la aldolasa generados por clorhidrato de guanidina y la modulación de esos cambios por trehalosa.


OBJETIVOS ESPECÍFICOS

 Caracterizar la cinética de desactivación de la aldolasa en presencia de clorhidrato de guanidina.

 Caracterizar la reactivación de la aldolasa resultante de la dilución de la guanidina.

 Determinar los efectos de la trehalosa sobre la desactivación de la aldolasa mediada por clorhidrato de guanidina.

 Evaluar los efectos de la trehalosa sobre la reactivación de la aldolasa resultante de la dilución de la guanidina.

 Estudiar los efectos de la guanidina y la trehalosa sobre la estructura de la aldolasa.

MATERIALES Y MÉTODOS

La aldolasa de músculo de conejo (fructosa – 1,6 – bisfosfatasa), el sulfato de hidrazina, el DTT, el EDTA y la trehalosa, se adquirieron en Sigma Co (EUA). El clohidrato de guanidina se obtuvo en Roche. Las sales de fosfatos de sodio para hacer el amortiguador de fosfatos fueron adquiridas en J. T Baker.

ELECTROFORESIS

La pureza de la enzima fue verificada corriendo un gel de acrilamida/bisacrilamida.

Se realizó un SDS-PAGE usando 10 % de acrilamida en una cámara de electroforesis Mini Protean II, en la que se agregó la solución del gel separador y luego la del concentrador (colocando un peine de 5 pozos), los cuales se prepararon previamente.

Para la preparación de la muestra se calculó el volumen necesario para tener concentraciones de 20 y 40 μg de aldolasa. Luego se incubaron durante 10 minutos a 30 °C. Después se cargaron en el gel que se corrió a 50 V durante 1 hora.

Se tiñó el gel con azul de coomassie. Se sumergió en la solución durante 1 hora. Posteriormente se destiñó con una solución de ácido acético y metanol hasta visualizar las bandas claramente y un fondo desteñido.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

La concentración de la aldolasa de músculo de conejo se determinó leyendo su absorbancia en un espectrofotómetro DU 650 Beckman, a 280 nm. Se usó el coeficiente de extinción molar $E_{280} = 0.938 \text{ cm}^2\text{mg}^{-1}$ (Donovan, 1964).

$$C_P = \frac{\lambda_{280}}{(E_{280})(V)} V_T (ml)$$

(1)

Donde C_P es la concentración de proteína en mg/ml, λ_{280} = la medida de la longitud de onda obtenida, E_{280} = coeficiente de extinción, V = volumen de la muestra añadidos en ml., V_T = volumen total de la muestra mas el amortiguador.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para los experimentos al equilibrio, la desactivación de la enzima se realizó incubándola por 24 horas en un amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM y diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina, a un pH de 7.4 con una concentración de 200 μ g/ml de aldolasa, en presencia o ausencia de trehalosa 600 mM, a una temperatura de 30 °C. La incubación se llevó a cabo en un baño PolyScience (PolyScience Co. IL) con la temperatura controlada (\pm 0.1 °C).

La actividad residual se midió en un espectrofotómetro Olis DW 2000, con el control de la temperatura a 30 ° C, mediante la aparición de gliceraldehído-3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato que reacciona con sulfato de hidrazina para formar hidrazona. La formación de hidrazona se midió a 240 nm usando un coeficiente molar de extinción de $2.73 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Sygusch y Beaudry, 1984).

Para la desactivación se incubaron 200 μ g aldolasa/ml en el amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, clorhidrato de guanidina 6 M a 30 °C. En otro experimento se incubó la enzima en las mismas condiciones que la anterior excepto que al amortiguador se le agregó trehalosa 600 mM. La actividad se midió al momento de agregar la aldolasa al desnaturizante.

La reactivación se realizó por dilución. La enzima desactivada en clorhidrato de guanidina 6 M, se diluyó 100 veces en amortiguador de fosfato de sodio 10 mM a pH de 7.4 y temperatura de 30 ° C. La actividad se midió al agregar la aldolasa

al medio de renaturalización y se incubó por diferentes tiempos en un baño giro-rotatorio Shaker G76, a la misma temperatura, hasta que se llegó nuevamente a recuperar la actividad de la enzima. Se midió una concentración final de aldolasa reactivada de 2 $\mu\text{g/ml}$. Asimismo se preparó otro medio de renaturalización con amortiguador de fosfatos 10 mM y trehalosa 600 mM, donde se hizo la reactivación de las dos muestras desnaturalizadas en guanidina 6 M, la que estaba libre de trehalosa y la que contenía trehalosa 600 mM.

Para realizar cada ensayo, se incubó en una celda de cuarzo amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, hidrazina 3.5 mM, EDTA 0.1 mM, Fructosa-1,6-Difosfato 0.1 mM, y la enzima en una concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$, a un volumen final de 2 ml, pH de 7.4 a temperatura constante de 30 ° C. La curva del blanco se realizó midiendo amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, con hidrazina 3.5 mM, EDTA 0.1 mM, y Fructosa-1,6- Difosfato 0.1 mM, ya sea en ausencia o presencia de trehalosa 600 mM. Después se agregó la enzima para medir su actividad residual. A cada punto se le resto el blanco. De los datos se obtuvo el porcentaje de actividad residual de la enzima y se graficó contra la concentración de clorhidrato de guanidina y contra tiempo utilizando el programa Origin 6.0. (Microcal Software, Inc. MA).

FLUORESCENCIA

Se hicieron ensayos de fluorescencia intrínseca de la proteína para seguir los cambios en la estructura de la aldolasa desnaturalizada en distintas concentraciones de cloruro de guanidina. La enzima se incubó durante 24 horas, con una concentración de proteína de 200 $\mu\text{g/ml}$ con un amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM y diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina obtenidas a partir de una solución 7 M, en presencia y ausencia de trehalosa 600 mM, con un pH de 7.4 y una temperatura constante de 30 ° C en un volumen final de 2 ml.

Los cambios de fluorescencia se midieron en un espectrofluorómetro ISS Photon Counting Spectrofluorometer (PCI) (ISS, Urbana, IL), termorregulado a 30 ° C. La fluorescencia intrínseca de la proteína se siguió con una longitud de onda de excitación (λ) de 290 nm. Se midió un espectro de emisión de 310 a 420 nm. Los slits se ajustaron a 5 nm. Del espectro obtenido se calculó el centro de masa espectral o el promedio de la longitud de onda de emisión (λ_{av}) con la siguiente fórmula (Ramirez-Silva y cols., 2001).

$$\lambda_{av} = \frac{\sum \lambda I(\lambda)}{\sum I(\lambda)}$$

(2)

Donde λ es la longitud de onda en nm, I es la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda respectiva, que se graficó contra la concentración de clorhidrato de guanidina en el programa Origin 6.0. (Microcal Software, Inc. MA)

La curva del blanco, se realizó midiendo amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM y su concentración correspondiente de clorhidrato de guanidina adicionando o no trehalosa 600 mM. Después se midió la muestra con la enzima para obtener su espectro. A cada trazo se le restó el espectro del blanco.

DICROÍSMO CIRCULAR

Las muestras de aldolasa se incubaron por 24 horas hasta llegar a un equilibrio donde ya no hay cambios en la estructura de la proteína ya que está completamente desnaturalizada. Se añadió una concentración de 1 mg/ml de proteína en un amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 1 mM. A una muestra se le adicionó trehalosa 600 mM. A las otras dos muestras se les adicionó clorhidrato de guanidina 6 M y una contenía trehalosa 600 mM. Todo se hizo a un pH de 7.4 y una temperatura de 30 °C.

Se midieron los espectros de las muestras en un espectropolarímetro JASCO J-715. En el ultravioleta lejano, seguimos el espectro de la estructura secundaria. Las muestras que contenían clorhidrato de guanidina, con y sin trehalosa 600 mM, se midieron de 260 a 210 nm. La medición del espectro de la enzima nativa, con y sin trehalosa, fue de 260 a 190 nm. El experimento se llevó a cabo en una cubeta de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz, a una temperatura de 30 °C. Los datos se siguieron en incrementos de 1 nm cada 2 segundos.

Los espectros en el ultravioleta cercano nos dan información de la estructura terciaria de la proteína. Se llevaron a cabo barridos de 300 a 250 nm, para comparar los espectros de la enzima nativa en ausencia y presencia de trehalosa 600 mM, con los espectros de la aldolasa en 6 M de clorhidrato de guanidina, adicionando o no trehalosa 600 mM. Los espectros fueron realizados en una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz, a una temperatura de 30 °C. Los datos se reunieron en incrementos de 1 nm cada 2 segundos.

Los valores obtenidos de las muestras de referencia (blancos), el amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 1 mM, con y sin clorhidrato de guanidina 6 M, en ausencia y presencia de trehalosa 600 mM, sin la proteína fueron restados de su correspondiente espectro con la proteína.

El espectro se corrigió por concentración de proteína con la siguiente fórmula (Ramírez-Silva y cols., 2001):

$$[\Theta]_M = \frac{\Theta \times 100 \times M_r}{c \times l \times N_A} = \text{deg} \times \text{cm}^2 \times \text{dmol}^{-1} \quad (3)$$

Donde: Θ = elipticidad molar, M_r = peso molecular de la aldolasa = 39212, c = concentración de proteína en mg/ml, l = paso de luz en cm. N_A = número de residuos = 1452.

La concentración de proteína se midió antes del ensayo en un espectrofotómetro a 280 nm, como se indica en determinación de la concentración de proteínas, y después del experimento se verificó la concentración por el método de Lowry TCA para estar seguros de la cantidad de proteína obtenida en el ensayo.

ANÁLISIS DE LOS DATOS

Se analizaron los datos para obtener un modelo de desnaturalización por clorhidrato de guanidina con y sin trehalosa, donde se graficó el porcentaje de actividad residual contra concentración de guanidina.

Se analizaron también las cinéticas de reactivación donde se grafican los porcentajes de reactivación en el tiempo, para también proponer el modelo de reactivación y renaturalización de la enzima.

La curva de diferentes concentraciones de guanidina contra el porcentaje de actividad se ajustó con la siguiente ecuación:

$$A_R = Fm_0 + Fm_1 \left(\frac{x^a}{k_1^a + x^a} \right) + Fm_2 \left(\frac{x^b}{k_2^b + x^b} \right)$$

(4)

Donde A_R es la actividad residual, Fm_0 es el valor del estado inicial, Fm_1 es la amplitud del primer estado, Fm_2 es la amplitud del segundo estado, k_1 es el valor de la primera fase, k_2 es el valor de la segunda fase, a es constante de equilibrio de la primera fase, y b es constante de equilibrio de la segunda fase.

Las cinéticas de reactivación se analizaron con una ecuación de asociación de un paso (monofásica) y de dos pasos (bifásica):

$$A_R = A_1(1 - e^{-k_1 t}) \quad (5)$$

$$A_R = A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad (6)$$

$$A_R = A_0 + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) + A_3(1 - e^{-k_3 t}) \quad (7)$$

Donde A_R es la actividad residual, A_1 es la amplitud de la primera fase, A_2 es la amplitud de la segunda fase, A_3 es la amplitud de la tercera fase, k_1 es la constante de velocidad aparente de la primera fase, k_2 es la constante de velocidad aparente de la segunda fase, k_3 es la constante de velocidad aparente de la tercera fase y t es el tiempo (Henley y Sadana, 1986).

La curva de centro de masa espectral de la aldolasa contra concentración de guanidina se ajustó con la siguiente ecuación:

$$A_R = \frac{A_2 + (A_1 - A_2)}{1 + \frac{x}{\left(\frac{A_1 + A_2}{2}\right)^p}}$$

(8)

Donde A_R es la actividad residual, A_1 es el valor del estado inicial, A_2 es el valor del estado final, x es la constante de equilibrio k_{eq} .

La curva de centro de masa espectral de la aldolasa con el disacárido trehalosa contra concentración de guanidina se ajustó con la siguiente ecuación:

$$A_R = Fm_0 + Fm_1 \left(\frac{x^a}{(k_1^a + x^a)} \right) + Fm_2 \left(\frac{x^b}{(k_2^b + x^b)} \right)$$

(9)

Donde A_R es la actividad residual de la proteína, Fm_0 es el valor del estado inicial, Fm_1 es el valor de la amplitud de la primera fase, Fm_2 es la amplitud de la segunda fase, k_1 es el valor de la primera fase, k_2 es el valor de la segunda fase, a es constante de equilibrio de la primera fase, y b es constante de equilibrio de la segunda fase.

RESULTADOS

Para verificar el grado de pureza de la proteína y descartar algún tipo de contaminación, se hizo un gel de poliacrilamida donde solamente se encontró una banda. El peso molecular obtenido, es el indicado para un monómero del tetrámero de la aldolasa de aproximadamente 40 kDa (Fig. 11).

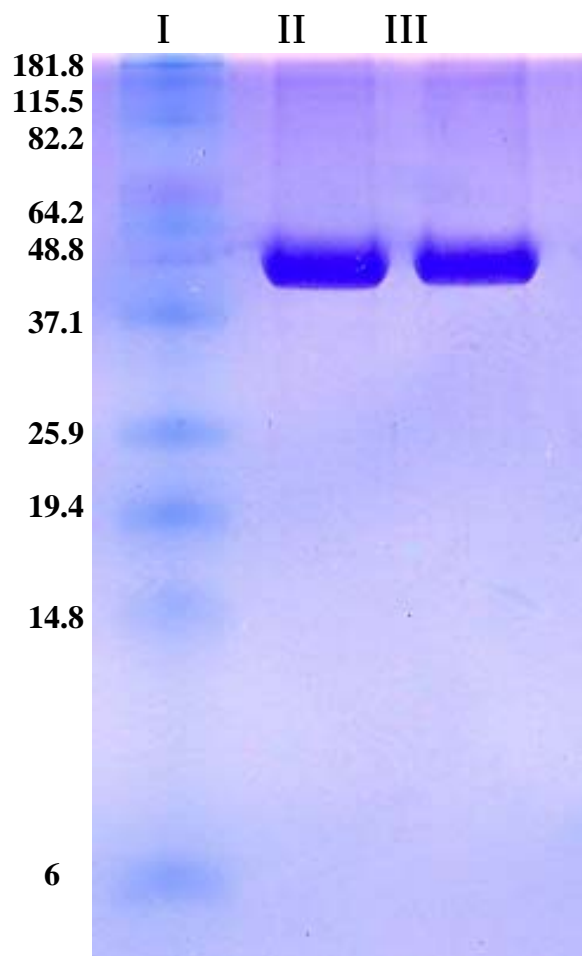


FIGURA 11. Gel de acrilamida. Observamos la banda de la proteína de 40 kda en los carriles II y III con una concentración de 40 y 20 μ g respectivamente. En el primer carril (I) están las bandas de pesos moleculares conocidos.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

En este estudio se cuantificó la actividad de la aldolasa, al catalizar su reacción glucolítica de fructosa - 1,6 – bisfosfato a gliceraldehído - 3 – fosfato y dihidroxiacetona fosfato, siguiendo su desactivación con clorhidrato de guanidina a distintas concentraciones. También se cuantificó su reactivación diluyendo la concentración de clorhidrato de guanidina.

INACTIVACIÓN DE LA ALDOLASA.

Para inactivar a la aldolasa, ésta se incubó en diferentes concentraciones de clorhidrato de guanidina, durante 24 horas. En ausencia (Fig. 10, cuadros) y presencia de trehalosa 600 mM (Fig. 10, círculos). La actividad se midió con una concentración final de 2 µg/ml de proteína. En la curva de desactivación de aldolasa (Fig. 12, cuadros) observamos que la actividad decreció proporcionalmente conforme aumentó la concentración de guanidina. Por arriba de 2.5 M ya no se observó actividad y así permaneció hasta 6 M de clorhidrato de guanidina. Si comparamos con la otra curva de aldolasa con trehalosa (Fig. 12, círculos), vemos que la trehalosa hizo ligeramente resistente a la aldolasa pues la pérdida de actividad se dio en presencia de una mayor concentración de guanidina y llegó a su totalidad a 3.5 M de clorhidrato de guanidina. En el ajuste de las curvas se observó que hay dos fases, es decir, se detectó un intermediario, para la curva de aldolasa entre 0.25 M y 0.5 M. En cambio en la curva de aldolasa que se desactivó con distintas concentraciones de guanidina y trehalosa se observó este intermediario entre 1 y 1.2 M de clorhidrato de guanidina. Después durante la segunda fase se llegó a una desactivación total de la enzima. Los parámetros para estas desactivaciones los podemos ver en la Tabla 1.

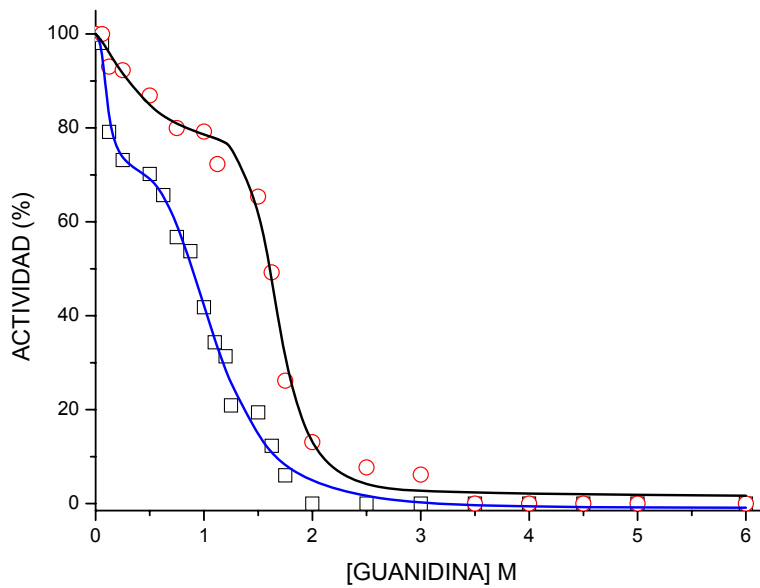


FIGURA 12. Efecto de la guanidina sobre la actividad de aldolasa en ausencia y presencia de trehalosa 600 mM. Se incubaron 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína en amortiguador de fosfato de sodio 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM y distintas concentraciones de clorhidrato de guanidina. El pH fue de 7.4 y 30 $^{\circ}\text{C}$ de temperatura. Trehalosa 600 mM (círculos). Sin trehalosa (cuadros). Se midió la actividad de cada muestra en una concentración final de 2 $\mu\text{g/ml}$ de proteína, por el método de hidrazina-hidrazona con una concentración final de 3.5 mM Hidrazina, 100 μM EDTA, 100 μM Fructosa-1,6-.bisfosfato en amortiguador de fosfato de sodio 10 mM con un espectrofotómetro Olis DW 2000, a una longitud de onda de 240 nm.

TABLA 1. Parámetros de la inactivación de la aldolasa por clorhidrato de guanidina en distintas concentraciones.

	Fm ₀	Fm ₁	k ₁	a	Fm ₂	k ₂	b
Dif. [Guanidina]	100 ±2.5	27.57 ±3.36	0.099 ± 0.015	4.98 ± 2.5	73.44 ± 2.48	1.09 ± 0.025	4.14 ± 0.35
Dif. [Guanidina] +Trehalosa 600 mM	100	27.57	0.43 ± 0.7	1.45± 0.34	71.33 ± 1.38	1.68 ± 0.017	14.18 ± 1.88

TABLA 1. **Fm₀** es el valor del estado inicial, **Fm₁** es la amplitud del primer estado, **Fm₂** es la amplitud del segundo estado, **k₁** es el valor de la primera fase, **k₂** es el valor de la segunda fase, **a** es constante de equilibrio de la primera fase, y **b** es constante de equilibrio de la segunda fase.

REACTIVACIÓN DE LA ALDOLASA.

ENZIMA INACTIVADA EN AUSENCIA DE TREHALOSA

La reactivación se realizó por dilución de la aldolasa inactivada con una concentración de 200 µg/ml de proteína en el amortiguador de desnaturalización descrito en Materiales y Métodos, por 24 horas a 30 ° C. La enzima desnaturalizada en ausencia de trehalosa se diluyó 100 veces en un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4, y se incubó a 30 ° C. Se midió la actividad desde un tiempo cero con la enzima totalmente inactiva. La actividad se siguió, midiendo la cinética cada 3 minutos durante dos horas, incubando las muestras renaturalizadas en un baño a 30 ° C, y no se recuperó la actividad (Fig. 13), lo que nos indica que tuvimos una desnaturalización irreversible.

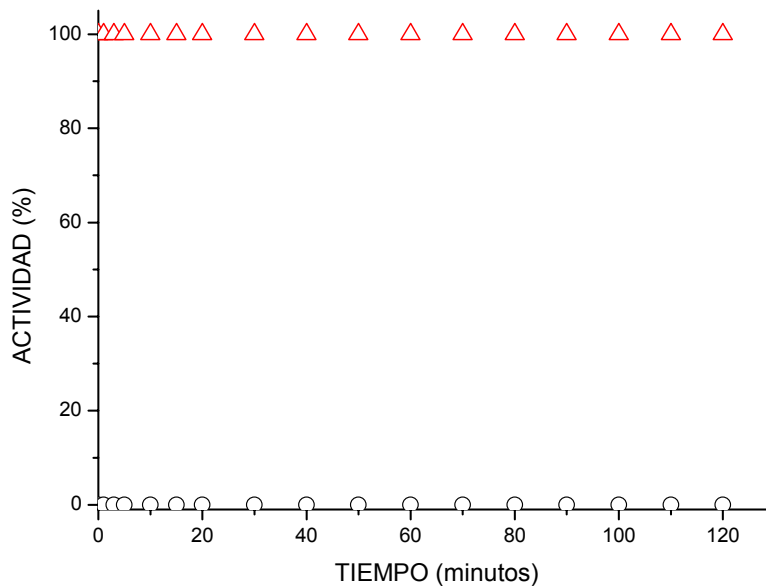


FIGURA 13. Reactivación de la aldolasa desactivada en ausencia de trehalosa. Se incubó la enzima en amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM y 6 M de clorhidrato de guanidina, a pH 7.4 y 30 ° C con una concentración de proteína de 200 µg/ml. Se llevó a cabo la reactivación diluyendo la proteína 100 veces en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4, con una concentración final de enzima de 2 µg/ml. Los círculos representan el promedio de tres ensayos, los triángulos muestran la actividad de la enzima nativa (100%).

Los resultados de reactivación fueron diferentes dependiendo de si en el medio de reactivación estuvo presente la trehalosa o no. Si la aldolasa que fue desactivada sin trehalosa, se reactivó por medio de una dilución 1 a 100 de la enzima en presencia de trehalosa 600 mM en el amortiguador de fosfatos, se obtuvo una reactivación del 40% a los 60 minutos que permaneció estable hasta los 160 min (Fig. 14). La cinética de reactivación fue bifásica, mostrando un componente rápido y otro lento (Tabla 2).

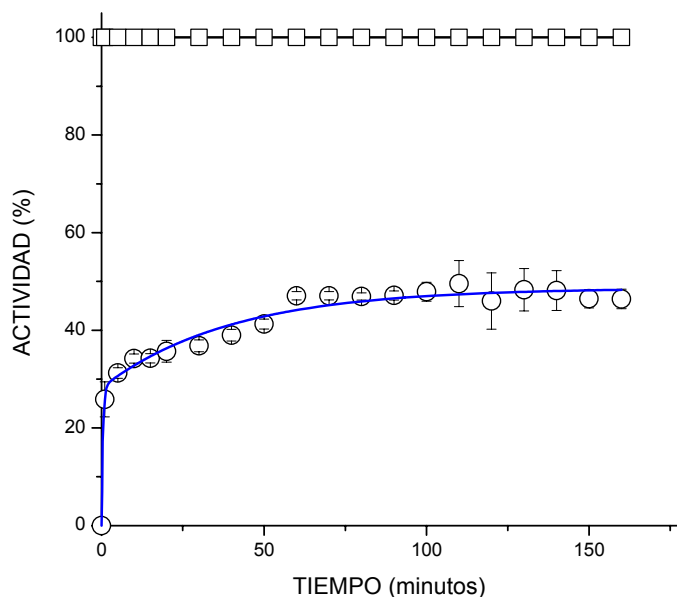


FIGURA 14. Reactivación de aldolasa previamente desactivada en guanidina 6 M. Se desactivó la aldolasa con una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$, en amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM y cloruro de guanidina 6 M. La reactivación se llevó a cabo diluyendo la enzima 100 veces en amortiguador de fosfatos 10 mM, trehalosa 600 mM, pH 7.4 y 30 ° C. Se siguió la reacción de la hidrazina para formar hidrazona a 240 nm. Los círculos son el promedio de tres experimentos con su desviación estándar y los cuadros representan la actividad de la enzima nativa. La curva es un promedio de tres ensayos con su desviación.

ENZIMA INACTIVADA EN PRESENCIA DE TREHALOSA 0.6 M.

También los resultados de reactivación fueron diferentes dependiendo de si en el medio de inactivación estuvo presente la trehalosa o no. Se inactivaron 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína en el amortiguador de desnaturalización con 6 M de clorhidrato de guanidina y 600 mM del carbohidrato trehalosa, durante 24 horas, para

posteriormente reactivar haciendo la dilución 1 a 100 en un amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 a 30 ° C. La concentración final de clorhidrato de guanidina fue de 60 mM y 6 mM de trehalosa. Esta vez la enzima se reactivó rápidamente conforme pasó el tiempo y al llegar a 20 minutos la enzima había recuperado su actividad totalmente (Fig. 15). La curva es monofásica, es decir solo se observó un componente rápido.

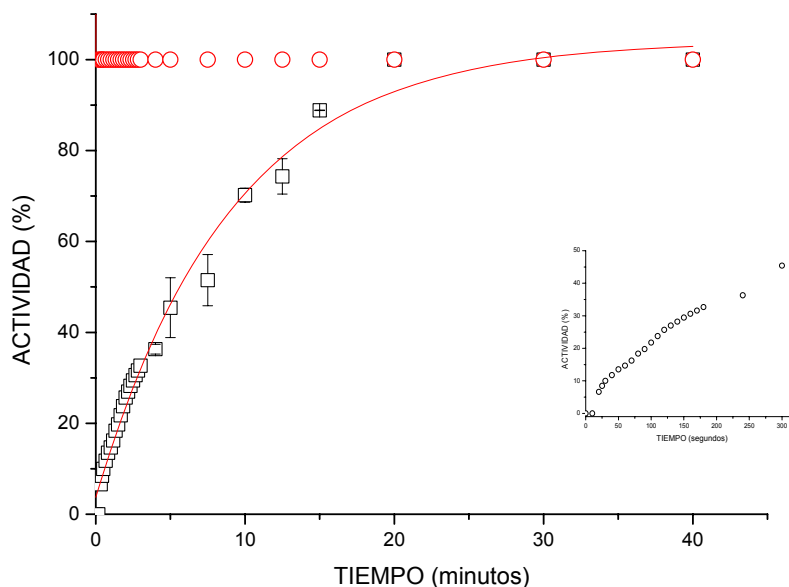


FIGURA 15. Reactivación de aldolasa desactivada previamente en guanidina 6 M con trehalosa 600 mM. Se desactivaron 200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína en amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, clorhidrato de guanidina 6 M, con trehalosa 600 mM, a pH de 7.4 y temperatura de 30 ° C por 24 horas. Se reactivó por dilución 1 a 100 de la proteína en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 7.4 a 30 ° C. Se midió con el método hidrazina-hidrazona a 240 nm, en un espectrofotómetro Olis DW 2000. Los cuadros son el promedio de 3 ensayos \pm su desviación estándar, los círculos son la aldolasa nativa. En el recuadro A, se ven los puntos de la reactivación en los primeros 5 minutos (300 segundos).

En la Figura 16, vemos la cinética de reactivación de aldolasa en presencia de trehalosa 600 mM a pH 7.4 y 30 °C. Esta vez la enzima se desactivó en presencia de trehalosa. Igual que en los ensayos anteriores la reactivación se hizo por dilución 1 a 100, aunque la trehalosa se mantuvo 0.6 M. En la curva de reactivación de la Figura 16 observamos que ésta fue más lenta, con un componente rápido similar a la enzima sin trehalosa pero desembocando rápidamente en una fase lenta cuando tenía 40% de actividad a los 20 minutos, llegando a 70% de actividad a los 140 minutos, finalmente a los 900 minutos llega a su máximo de actividad (95 %), manteniéndose así hasta los 1440 minutos. En cambio cuando se desactivó con trehalosa, y ésta fue diluida 100 veces al igual que la enzima y la guanidina, entonces la aldolasa se reactivó por completo dentro de los primeros 20 minutos como lo vemos en la Figura 15.

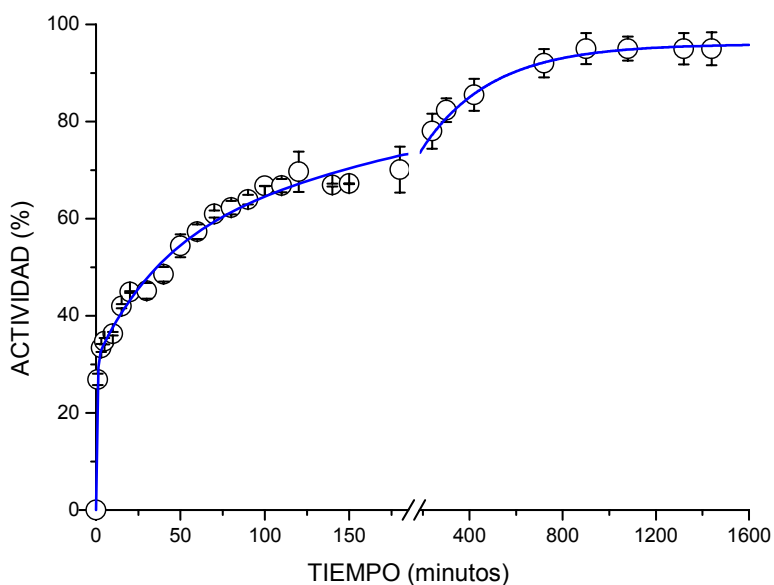


FIGURA 16. Cinética de reactivación de aldolasa desactivada con guanidina 6 M y trehalosa 600 mM. La desactivación se llevó a cabo en amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM a pH de 7.4 y 30 °C, por 24 horas. Se reactivó por dilución 1 a 100, en el medio de dilución se adicionó trehalosa 600 mM con el amortiguador de fosfatos pH 7.4, con una temperatura constante de 30 ° C. Los círculos son el promedio de tres ensayos con su desviación estándar.

TABLA 2. Parámetros cinéticos de la reactivación de la aldolasa por dilución 1:100.

Desactivación Guanidina 6 M	Reactivación Guanidina 0.6 M	$k_1 \text{ min}^{-1}$	$A_1 (\%)$	$k_2 \text{ min}^{-1}$	$A_2 (\%)$	$k_3 \text{ min}^{-1}$	$A_3 (\%)$
0 Trehalosa	0 Trehalosa	-	-	-	-	-	-
0 Trehalosa	600 mM Trehalosa	39.74 ± 8.34	20.42 ± 1.51	0.44 ± 0.15	28.24 ± 2.4	-	-
600 mM Trehalosa	6 mM Trehalosa	8.14 ± 0.96	101.86 ± 4.12	-	-	-	-
600 mM Trehalosa	600 mM Trehalosa	1.88 ± 0.46	30.89 ± 1.5	0.026 ± 0.0075	23.71 ± 4.28	0.0033 ± 0.00063	41.35 ± 4.11

TABLA 2. k_1 es la constante de velocidad aparente de la primera fase, k_2 es la constante de velocidad aparente de la segunda fase, k_3 es la constante de velocidad aparente de la tercera fase, A_1 es la amplitud de la primera fase, A_2 es la amplitud de la segunda fase, A_3 es la amplitud de la tercera fase,

Las constantes de equilibrio para el modelo, donde la proteína que fue desactivada sin trehalosa y se reactivó con trehalosa 600 mM, son: para $k_1 = 39.74 \pm 8.34 \text{ min}^{-1}$ y para $A_1 = 20.42 \pm 1.51 \%$. Para $k_2 = 0.44 \pm 0.15 \text{ min}^{-1}$ y para $A_2 = 28.24 \pm 2.4\%$ (Tabla 2). La proteína reactivada solo llegó al 48 %, en el proceso más lento, no toda la población de proteína inicial vuelve a su estado activo. El 62 % de la población que no se reactivó probablemente se va a un estado de agregación como lo reporta Pan en el 2003.

La reactivación de la enzima que se desactivó con trehalosa y se reactivó diluyendo 100 veces sin adicionar trehalosa en el medio de reactivación es un proceso rápido con un solo componente. Las constantes cinéticas obtenidas son: para $k_1 = 8.14 \pm 0.96 \text{ min}^{-1}$ y para $A_1 = 101.86 \pm 4.12$ (Tabla 2).

Como observamos durante la desactivación con clorhidrato de guanidina cuando llegamos a la concentración de 6 M después de 24 horas la actividad es

nula. Al determinar las cinéticas de desactivación de la aldolasa en presencia de guanidina 6 M vemos que la pérdida de actividad se da desde el primer segundo.

Habiendo analizado los resultados de actividad, nos preguntamos qué pasaría con la estructura de la aldolasa en presencia de 6 M de clorhidrato de guanidina y si la trehalosa evitaría la desnaturalización de la enzima. Para ver los cambios que habría en la estructura secundaria y terciaria de la proteína por el agente caotrópico se hicieron trazos de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano y cercano.

DICROÍSMO CIRCULAR

Para determinar el efecto del clorhidrato de guanidina en la estructura secundaria y terciaria de la aldolasa se hicieron experimentos de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano y cercano, donde se comparó la estructura de la proteína en ausencia y presencia de trehalosa.

Para realizar el ensayo se incubó la enzima a una concentración de 1 mg/ml, por 24 horas con trehalosa 600 mM (Fig 17, círculos) y sin trehalosa (Fig 17, cuadros), con clorhidrato de guanidina 6 M (Fig 17, triángulos) y con clorhidrato de guanidina 6 M más trehalosa 600 mM (Fig 17, rombos). El espectro se midió en una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz, medidos cada 2 segundos y son el promedio de tres espectros. La enzima nativa sin trehalosa se pudo medir de 250 hasta 190 nm, y vemos el espectro característico de una estructura secundaria alfa-beta (cuadros), lo cual corresponde a nuestra proteína que es un barril α/β (Pan, 2003). Si comparamos el espectro de la aldolasa, con el espectro de la enzima con trehalosa (círculos) vemos a los dos espectros indistinguibles uno del otro (Fig. 17). Esto significa que la estructura secundaria de

la aldolasa se mantiene de la misma forma en ausencia o presencia de trehalosa 600 mM.

Los espectros de la enzima desnaturalizada se pudieron medir solamente desde 250 a 210 nm, ya que el clorhidrato de guanidina hace interferencia a bajas longitudes de onda porque sube mucho el voltaje y no se pueden obtener el trazo hasta 190 nm. En estos dos espectros observamos cómo se perdió por completo la estructura secundaria de la aldolasa con el clorhidrato de guanidina 6 M, ya sea en ausencia (Fig. 17, triángulos) o presencia de trehalosa 600 mM (Fig. 17, rombos). Con estos datos se observó que la trehalosa no protege la estructura secundaria de la aldolasa en presencia de clorhidrato de guanidina 6 M.

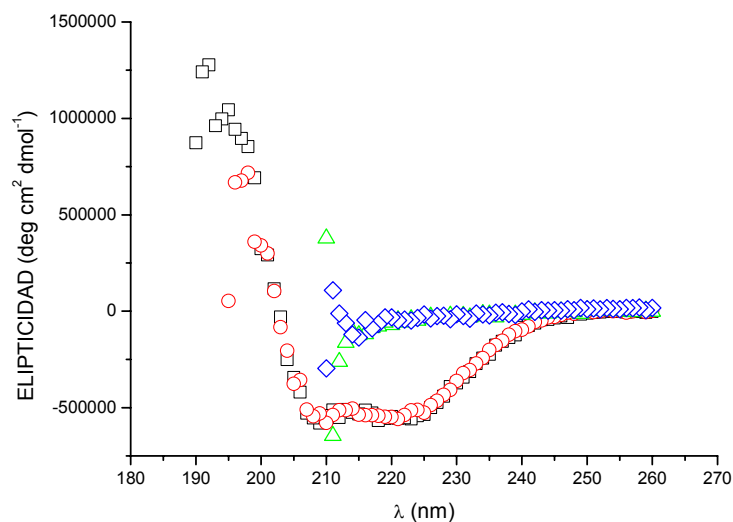


FIGURA 17. Espectros de dicroísmo circular de la aldolasa en el ultravioleta lejano. Se incubó 1 mg/ml de aldolasa en un amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 1 mM, (cuadros), y con trehalosa 600 mM (círculos). Se desnaturalizó la misma cantidad de proteína en amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 1 mM, con clorhidrato de guanidina 6 M sin trehalosa (triángulos) y con trehalosa (rombos), todo en un pH

de 7.4 y 30 ° C. El espectro se midió en espectropolarímetro JASCO J-715, con termorregulación de temperatura a 30 ° C, en una celda de cuarzo de 0.1 cm de paso de luz, con valores registrados cada dos segundos. Cada trazo es el promedio de tres espectros.

En el espectro de dicroísmo circular del ultravioleta cercano podemos observar un espectro correspondiente a la estructura terciaria de la aldolasa, en las longitudes de onda de 260 a 210 nm. En la Figura 18 observamos los espectros de la aldolasa en el ultravioleta cercano. Se usó una concentración de 1 mg/ml de proteína. Las curvas de la enzima nativa (Fig 18, cuadros), como los de la aldolasa con trehalosa (Fig 18, círculos) son indistinguibles una de la otra. También con base en estos espectros vemos que la estructura terciaria de la aldolasa no cambia en presencia de trehalosa. Los espectros de la enzima desnaturalizada, sin trehalosa (Fig 18, triángulos) y con 600 mM de trehalosa (Fig 18, rombos) se ven carentes de estructura, los espectros son iguales. Entonces tanto en presencia como en ausencia de trehalosa con clorhidrato de guanidina 6 M se pierde la señal del espectro en el ultravioleta cercano, lo que nos indica que se perdió estructura secundaria completamente.

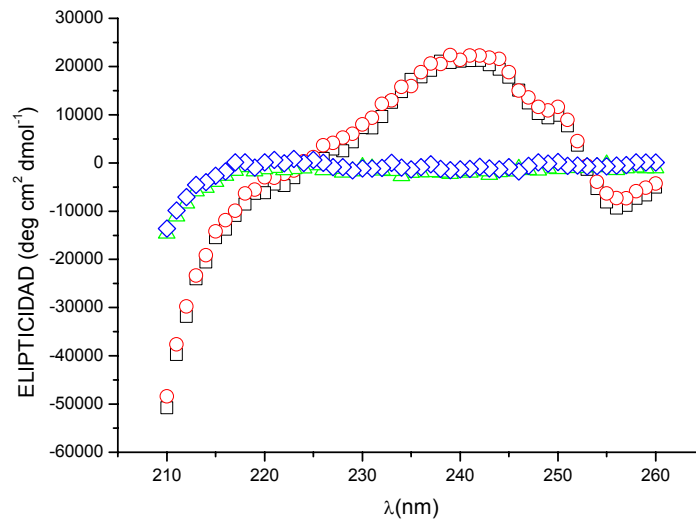


FIGURA 18. Espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta cercano. Se incubó 1 mg/ml de aldolasa en un amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 1 mM, (cuadros), y con trehalosa 600 mM (círculos). Se desnaturizó, 1 mg/ml de proteína en el amortiguador de fosfatos 10 mM, DTT 1 mM, con clorhidrato de guanidina 6 M (triángulos) y con trehalosa (rombos), todo en un pH de 7.4 y 30 ° C. El espectro se midió en una celda de cuarzo de 1.0 cm de paso de luz. Se muestra el promedio de tres espectros.

FLUORESCENCIA

Durante los ensayos al equilibrio usando la fluorescencia intrínseca de la proteína, observamos cambios en la estructura de la aldolasa. La aldolasa tiene 3 triptofanos por monómero que son los que se siguen durante su exposición al espectrofluorómetro (<http://www.rcsb.org/pdb> : Aldolase from rabbit muscle. P00883).

Al observar los espectros de emisión de la aldolasa en distintas concentraciones de clorhidrato de guanidina se observó que el centro de masa espectral tuvo un corrimiento hacía el rojo desde 330.16 nm de la enzima nativa hasta 354.1 nm de la enzima desnaturalizada en 6 M de clorhidrato de guanidina. Esto indicó que hubo cambios en la estructura de la aldolasa, compatibles con la desnaturalización de la enzima (Fig. 19). Si analizamos la intensidad de fluorescencia de los espectros vemos que la intensidad de la aldolasa nativa es de 8340 ctas, (Fig 19, cuadros) al ir aumentando ligeramente las concentraciones de clorhidrato de guanidina aumentó la intensidad a 10,500 ctas. con la concentración de 60 mM de clorhidrato de guanidina (Fig 19, círculos). A partir de 900 mM (Fig 19, triángulos invertidos) comienza a bajar la intensidad y el centro del espectro empieza a desplazarse hacía el rojo, llegando a su mínima intensidad de fluorescencia con 7,000 ctas. y su máximo desplazamiento a 354 nm con la concentración de clorhidrato de guanidina 6 M (Fig 19, cruces).

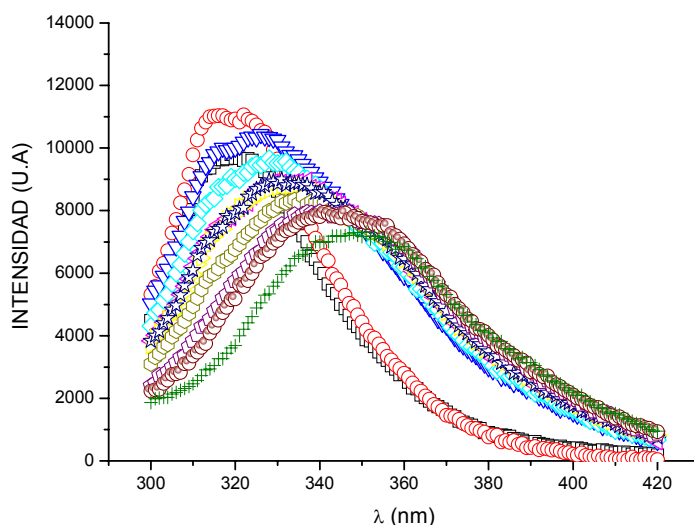


FIGURA 19. Espectros de fluorescencia de aldolasa en distintas concentraciones de guanidina. Se midió el espectro de fluorescencia con una λ exc = 290 nm, en un intervalo de 300 a 420 nm, con una celda de cuarzo de 1 cm. Se realizó a un pH de 7.4 y temperatura constante de 30 ° C. Nativa, cuadros. 60 mM, círculos. 900 mM, triángulos invertidos. 925 mM, rombos. 950 mM, triángulos izquierdos. 960 mM, triángulos derechos. 975 mM, hexágonos. 1 M, estrellas. 1.025 M, pentágonos. 1.050 M, octágonos. 6 M, cruces.

Si comparamos los espectros de la gráfica anterior (Fig, 19) con las muestras de aldolasa desnaturalizadas con clorhidrato de guanidina y 600 mM de trehalosa (Fig. 20), vemos que el corrimiento del centro de masa espectral hacia el rojo se da con mayor concentración de clorhidrato de guanidina en presencia del carbohidrato. Si observamos los espectros vemos que el de la enzima nativa tiene una intensidad de fluorescencia de 10,487 ctas (Fig. 20, cuadros), y va aumentando al ir subiendo la concentración de guanidina hasta los 960 mM donde la intensidad es de 12,250 nm (Fig. 20, triángulos derechos). A partir de esta concentración la intensidad comienza a bajar y el centro de masa se va desplazando hacia el rojo, hasta llegar a la mínima intensidad a 6 M de clorhidrato de guanidina y el máximo corrimiento de λ hasta 354.4 nm (Fig. 20, asteriscos).

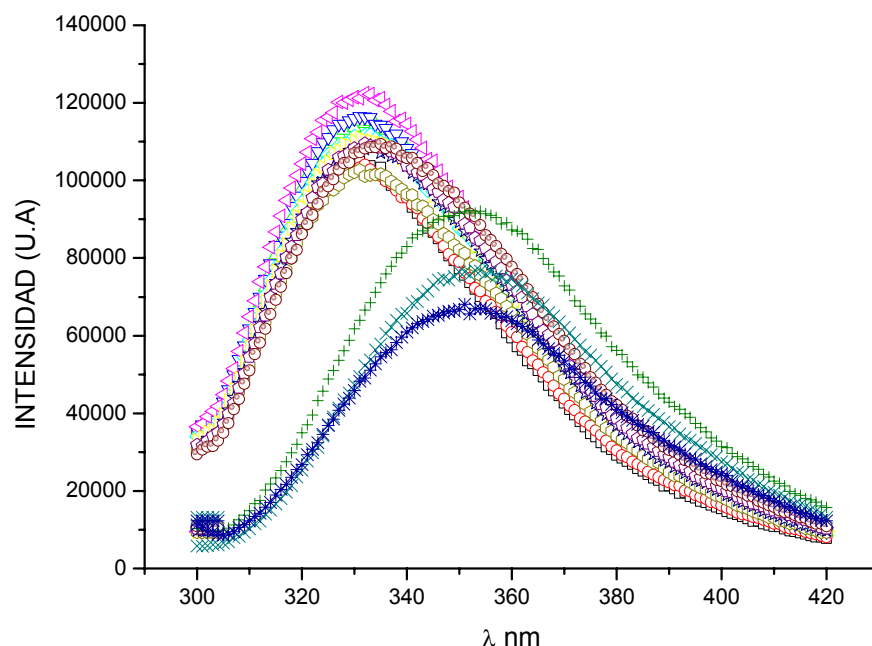


FIGURA 20. Espectros de fluorescencia de aldolasa con trehalosa en distintas concentraciones de guanidina. Se midió el espectro de fluorescencia con una $\lambda_{exc} = 290$ nm, en un intervalo de 300 a 420 nm, con una celda de cuarzo de 1 cm. Se realizó a un pH de 7.4 y temperatura constante de 30 ° C. Cuadros enzima nativa; círculos 60 mM; triángulos 900 mM; triángulos invertidos 925 mM; rombos 950 mM; triángulos izquierdos 1.025 M; hexágonos 1.050 M, estrellas 1.125 M, pentágonos 1.150 M; círculos con punto 1.250 M; cruces 2.5 M; equis 3.5 M y asteriscos 6 M de clorhidrato de guanidina.

Cuando observamos las curvas del centro de masa espectral de aldolasa y aldolasa con trehalosa desnaturalizadas en distintas concentraciones de guanidina (Fig. 21), observamos que conforme aumenta la concentración de guanidina, el centro de masa espectral también aumenta, es decir se da un corrimiento hacia el rojo, lo que nos indica una desnaturalización de la proteína. El centro de masa espectral se desplazó hacia el rojo conforme aumentó la concentración de guanidina desde 331 nm de la enzima nativa a 354 nm en la desnaturalizada

En la curva de inactivación con concentraciones crecientes de clorhidrato de guanidina en ausencia de trehalosa, observamos que la transición se llevó a cabo entre 0 y 1.5 M. Conforme aumentan las concentraciones de guanidina el centro de masa espectral se va desplazando hacia el rojo. La transición que nos muestra la curva es secuencial y se observa solo un paso de la enzima nativa a la desnaturalizada, lo que nos indica que no hay ningún intermediario estable. En presencia de trehalosa 600 mM, la curva es distinta y se necesita más concentración de guanidina para el desplazamiento del centro de masa espectral hacia el rojo. Aquí se ve una protección por el disacárido durante el proceso de desnaturalización. Además en la curva observamos intermediarios en el transcurso de la desnaturalización, que es donde vemos que el centro de masa espectral se mantiene constante entre 2 y 3 M de guanidina.

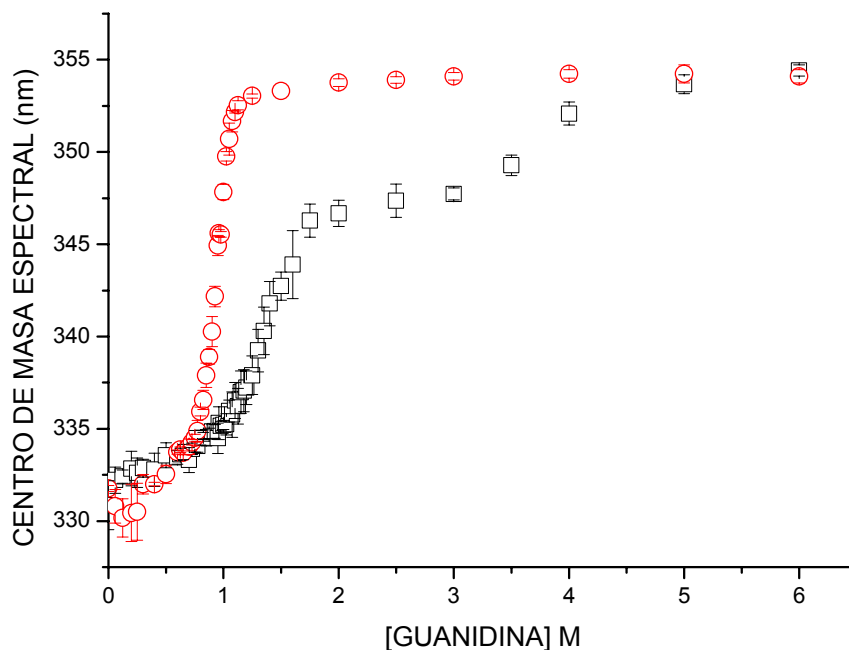


FIGURA 21. Desnaturalización de aldolasa en distintas concentraciones de guanidina con y sin trehalosa 600 mM. Con una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ de enzima, se desactivó en distintas concentraciones de clorhidrato de guanidina en un amortiguador de fosfato de

sodio 10 mM, DTT 10 mM, EDTA 1 mM, a pH de 7.4 y temperatura constante de 30 °C, durante 24 horas. La fluorescencia intrínseca de la proteína se midió en un espectrofluorómetro ISS PCI Photon Counting. La $\lambda_{exc} = 290$ nm. Se calculó el centro de masa espectral de la aldolasa con diferentes concentraciones de cloruro de guanidina en ausencia (círculos) y presencia (cuadros) de trehalosa 600 mM. Cada punto es un promedio de tres muestras con su desviación estándar.

TABLA 3. Parámetros de la desnaturalización de la aldolasa por distintas concentraciones de clorhidrato de guanidina.							
	Fm_0	Fm_1	k_1	a	Fm_2	k_2	b
[Guanidina]	100 ± 2.5	14.84 ± 0.47	1.37 \pm 0.019	5.97 \pm 0.37	6 \pm 0.58	3.83 \pm 0.09	15.81 \pm 5.47
[Guanidina] +Trehalosa 600 mM	332.1 \pm 0.26	354.13 \pm	0.93 \pm 0.006	-	-	-	-

TABLA 3. Fm_0 es el valor del estado inicial, Fm_1 es la amplitud del primer estado, Fm_2 es la amplitud del segundo estado, k_1 es el valor de la primera fase, k_2 es el valor de la segunda fase, a es constante de equilibrio de la primera fase, y b es constante de equilibrio de la segunda fase.

DISCUSIÓN

En este estudio se observó que la aldolasa de músculo de conejo puede ser desactivada y desnaturalizada con clorhidrato de guanidina.

Anteriormente, se han realizado estudios de la aldolasa donde se desnaturaliza con agentes caotrópicos. En la década de los sesentas, se empezaron a hacer estudios de desnaturalización y renaturalización de la aldolasa. Se disoció por urea, ácido clorhídrico, ácido acético y se volvió a renaturalizar obteniéndose un 65 % de recuperación (Steewagen y Schachman, 1962). Se desnaturalizó tanto por pH ácido (2.9) como por pH básico (12) y se volvió a renaturalizar al transferirla a un medio propicio (Deal y cols., 1963; Fasman y cols., 1970). Ha sido desnaturalizada con clorhidrato de guanidina y vuelto a renaturalizar parcialmente (Kawahara y Tadford, 1966; Chan y cols., 1973). Se ha disociado en subunidades, las cuales tienen actividad (Chan, 1970; Chan y Mawer, 1972). La enzima ha sido desnaturalizada con 3 M de urea y aprecian tres fases de desplegamiento, una rápida, una intermedia y la última lenta. Se propone un modelo cooperativo y otro secuencial para el desdoblamiento de la aldolasa. El modelo cooperativo para la aldolasa, incluye tres dominios, los cuales se mueven y se separan de la estructura inicial. En el modelo secuencial, un dominio sólo se puede desplegar si el anterior está completamente desplegado, es decir se observa una secuencia específica (Deng y Smith, 1998).

Otras proteínas globulares ya han sido también desplegadas con clorhidrato de guanidina como el factor de coagulación VIIa (FVIIa), una proteína transmembranal de tres dominios. Esta proteína se agrega durante el proceso de renaturalización. (Giren y cols, 2005). También la tripsina pancreática bovina y la ribonucleasa T1, entre otras de las tantas que han sido desnaturalizadas por medio del clorhidrato de guanidina (Camacho y Thirumalai, 1996).

El efecto del soluto compatible trehalosa que observamos durante el proceso de desnaturalización de la aldolasa con clorhidrato de guanidina depende de la concentración del agente caotrópico. Con pequeñas concentraciones de guanidina observamos una protección de la aldolasa por el disacárido. Cuando las concentraciones aumentan ya no se ve protección, la enzima pierde completamente tanto actividad como estructura.

Otras enzimas han sido desnaturalizadas con clorhidrato de guanidina y estabilizadas con el soluto compatible trehalosa. La cutinasa es una de ellas. Es una enzima dimérica. Se desnaturalizó y se encontró un intermediario. (Melo y cols., 2001). También la lisozima, que es un monómero, ha sido desnaturalizada con clorhidrato de guanidina y estabilizada con trehalosa (Lins y cols, 2004; Timasheff, 2002; Allison y cols, 1999). Otras proteínas que han sido estabilizadas con trehalosa son las α -amilasas, en donde encontraron intermediarios estables (Shokri y cols, 2006).

En nuestras manos, vemos que en presencia de guanidina 6 M, la aldolasa se desactiva y se desnaturaliza completamente. También se observan diferencias en el proceso de desnaturalización cuando se realiza en presencia de trehalosa. En presencia y ausencia de trehalosa observamos diferentes cinéticas, así como C_m de desnaturalización y reactivación. Además nuestros resultados mostraron que durante la desactivación, la trehalosa ayuda a estabilizar a la aldolasa, cuando la concentración de clorhidrato de guanidina no es mayor a 3 M.

Durante el proceso de reactivación, también observamos cambios muy interesantes en presencia de trehalosa. Anteriormente se hizo un estudio donde desnaturalizó a la aldolasa con clorhidrato de guanidina. Se renaturalizó por dilución. Para renaturalizarla se utilizó un amortiguador Tris-HCl 50 mM, mercaptoetanol 140 mM, BSA (1mg/ml) y 20 % de sacarosa. Por actividad, obtuvo un 85 % de recuperación (Chan y cols., 1973).

Por otra parte, también se intentó renaturalizar la aldolasa por dilución rápida, pero no se logró porque se agregó la proteína. Finalmente se pudo llevar a cabo la renaturalización mediante diálisis de la guanidina y se recuperó el 85 %, de la actividad y por estructura medida por dicroísmo circular CD a 222 nm (Pan y Smith, 2003)

Volviendo ahora a nuestros resultados, cuando renaturalizamos a la aldolasa desactivada con clorhidrato guanidina 6 M en ausencia de trehalosa, y diluimos 1:100 (fig. 13), no se obtuvo renaturalización. Por otro lado, si desnaturalizamos la aldolasa en presencia del disacárido trehalosa y diluimos 1:100, (fig. 15), obtuvimos alrededor de un 45 % de reactivación.

Ya en otras ocasiones se había obtenido renaturalización de la aldolasa. Se desnaturalizó a la aldolasa con urea y al disociar la urea por diálisis o dilución, se recuperó la actividad enzimática en un 65 % (Stellwagen y Schachman, 1962). También el tratamiento de la aldolasa con un pH de 2.9, y su posterior incubación en pH neutro resultó en reasociación de una manera rápida y espontánea. Después de la neutralización se obtuvo un 58% de enzima renaturalizada (Deal y cols., 1963). A la fecha, el mejor resultado, fue obtenido al desactivar la proteína con guanidina 6 M y reactivar la proteína en presencia de sacarosa y BSA donde se recuperó el 85 % de la actividad (Chan, 1973).

Cuando usamos trehalosa durante la desactivación la reacción fue reversible y la reactivación por dilución se llevó a cabo rápidamente ya que en 20 minutos obtuvimos la reactivación. Sin embargo las cinéticas tanto de desnaturalización como de renaturalización son tan rápidas que nos fue imposible seguirlas. Para la aldolasa que se desactivó con trehalosa y en la que se incluyó también trehalosa durante el proceso de reactivación observamos que la reactivación se llevó a cabo lentamente y en varias fases. Nuestros datos concuerdan con los trabajos ya realizados anteriormente con la aldolasa donde se

observa un intermediario durante el plegamiento (Pan y Smith, 2003; Deng y Smith, 1998; Chan, 1973).

En 2003, Pan y Smith intentaron hacer la desnaturalización de aldolasa con hidrocloreto de guanidina, para volver a reactivarla por dilución, y no lo lograron debido a la agregación de proteína. En contraste, sí lograron la renaturalización-reactivación por diálisis, llegando a un 80 % de renaturalización. En nuestras manos, la utilización del disacárido trehalosa para proteger a la enzima durante la desnaturalización, resultó en el 100 % de reactivación en 20 minutos al diluir al agente desnaturalizante.

Nuestros datos confirman lo ya sugerido por otros autores; que para recuperar la actividad de las proteínas después de un episodio de estrés debe eliminarse el soluto compatible (Sleator y Hill, 2002). En el caso de la aldolasa se observó que la trehalosa a altas concentraciones hace muy lenta la reactivación como puede verse en las constantes cinéticas. En este caso la reactivación fue bifásica, ya que pudimos apreciar al intermediario que se formó durante el proceso. Esto se atribuye a la viscosidad que da la trehalosa al medio de reactivación, ya que está inhibiendo los movimientos vibracionales de la proteína y hace muy lento el proceso, aunque finalmente la proteína llega a su estado nativo. Como observamos en la figura 5, la viscosidad va a dar estabilidad a la proteína durante la desnaturalización, pero también va a inhibir su transición conformacional hacia el estado nativo (Sampedro y Uribe, 2004). Es decir la viscosidad nos va a modificar el tiempo (k) que tarda la proteína en ir de un estado desnaturalizado hacia el nativo o viceversa. Esto concuerda con lo observado en la H^+ ATPasa, la cual se desactiva por calor o por deshidratación, pero es protegida por diferentes solutos compatibles. También se observó que la actividad de la H^+ ATPasa es inhibida por diferentes concentraciones de trehalosa, sacarosa o glicerol de manera proporcional a la viscosidad que estos solutos le confieren al medio (Sampedro y cols, 1998; 2001; 2002; Sampedro y Uribe, 2004).

En 1961, cuando Anfinsen logró desnaturalizar y renaturalizar a la ribonucleasa (descrito en Anfinsen (1973)), los científicos de la época se preguntaban cómo una proteína que ha perdido por completo sus estructuras terciaria y secundaria, podía volver a su forma nativa, y fue entonces cuando se esbozó la hipótesis de que el plegamiento y la asociación proteicas están dictadas por la secuencia de aminoácidos de la proteína (Deal, 1963). Para analizar esta hipótesis, se ha estudiado la desnaturalización-renaturalización de la aldolasa, donde se ha comprobado que la asociación y plegamiento están dictadas por la estructura primaria (Pan y Smith, 2003; Deng y Smith, 1998; Chan, 1973).

CONCLUSIONES

- 1) La aldolasa de músculo de conejo (fructosa – 1,6 – bisfosfatasa) se desnaturaliza en presencia de clorhidrato de guanidina 6 M.
- 2) La presencia de trehalosa durante la desnaturalización hace posible la posterior reactivación de la aldolasa.
- 3) La trehalosa hace más lenta tanto la desnaturalización como la renaturalización.
- 4) Se detectó un intermediario de desdoblamiento estable, pero inactivo.

PERSPECTIVAS

- 1) Detectar y caracterizar posibles intermediarios estables del plegamiento de la aldolasa estabilizada con trehalosa.
- 2) Estudiar la cinética de termoinactivación e inactivación por pH de la aldolasa.
- 3) Determinar la cinética de termorreactivación de la aldolasa.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Allison, D. S; Chang, B; Randolph, S y Carpenter, F, J. (1999). Hydrogen Bonding between Sugar and Protein is Responsible for Inhibition of Dehydration-Induced Protein Folding. *Arch. Biochem. And Biophys*, 365. 2: 289-298.
- 2) Alizadeh, P. y Klionsky, D.J. (1996) Purification and biochemical characterization of the *ATH1* gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 391: 273-278.
- 3) Anfinsen CB (1973) Principles that govern the folding of polypeptide chains. *Science* 181: 223-230.
- 4) Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van der Zee, P. y Wiemken, A. (1992) Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of *CIF1*, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur. J. Biochem.*, 209: 951-959.
- 5) Belton, P. S. y Gil, A. M. (1994). IR and raman-spectroscopies studies of the interaction of trehalose with hen egg-white lysozyme. *Biopolymers*, 34: 957-961.
- 6) Buono, P; D'armiento, F. P; Terzi, G; Alfieri, A. y Salvatore, F. (2001). Differential distribution of aldolase A and C in the human central nervous system. *Journal of Neurocytology* 30, 957-965.
- 7) Camacho, C y Thirumalai. (1996) Denaturants can accelerate folding rates in a class of globular proteins. *Prot. Sci.* 5 : 1826-1832.
- 8) Cansado, J., Soto, T., Fernández, J., Vicente-Soler, J. y Gacto, M. (1998) Characterization of mutants devoid of neutral trehalase activity in the fision yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Partial protection from heat-shock and high-salt stress. *J. Bact.*, 180: 1342-1345

- 9) Carpenter, J. F. y Crowe, J. H. (1989). An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry*, 28: 3916-3922.
- 10) Chan, W; Morse, D. E. y Horecker, B. L. (1967). Nonidentity of Subunits of Rabbit Muscle Aldolase. *Biochemistry*, 57: 1013-1020.
- 11) Chan, W. (1970). Matrix-Bound Protein Subunits. *Biochem. and Biophys. Res. Com*, 41 (5): 1198-1204.
- 12) Chan, W. y Mawer, H. M. (1972). Studies on Protein Subunits. II Preparation and Properties of Active Subunits of Aldolase Bound to a Matrix. *Arch. Of Biochem. and Biophys*, 149: 136-145.
- 13) Chan, W; Mort, J. S; Chong, D. K. K. y MacDonald, P. D. (1973). Studies on protein subunits. *J. Biol. Chem*, 248: 2778-2784.
- 14) Choi, K. H; Mazurkie, A. S; Morris, A. J; Utheza, D; Tolan, D. R. y Allen, K. N. (1999) Structure of a fructose-1,6-bis(phosphate) aldolase liganded to its natural substrate in a cleavage-defective mutant at 2.3 Å. *Biochemistry* v38 pp.12655-12664. Crowe, J. H; Crowe, L. M. and Mouradian. (1983). Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiol*; 20: 346-356.
- 15) Crowe, J. H; Hoekstra, F. A. y Crowe, L. M. (1992). Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 579-99.
- 16) Crowe, J. H; Carpenter, J. F. y Crowe, L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 6, 73-103.
- 17) Crowe, J. H; Crowe, L. M... Tablin, F. (2001). The Trehalose Myth Revisited: Introduction to a Symposium on Stablization of Cells in the Dry State. *Cryobiology*, 43:89-105.
- 18) De Virgilio, C., Bürckert, N., Bell, W. Jenö, P., Boller, T. y Wiemken, A. (1993) Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur. J. Biochem.*, 212: 315-323.

- 19) Deal, W. C; Rutter, W. J. y Holde, E. V. (1963) Reversible dissociation of aldolase into unfolded subunits. *Biochemistry*. 2: 246-251.
- 20) Deng, Y. y Smith, D. L. (1998). Hydrogen Exchange demonstrates tree domains in aldolase unfold sequentially. *J. Mol. Biol.* 294: 247-258.
- 21) Dobson, C. M. (2003). Protein Folding and Misfolding. *Nature*, 426: 884-890.
- 22) Dobson, C.M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B356, 133-145.
- 23) Donovan, J. (1964) The Spectrophotometric Titration of the Sulfhydryl and Phenolic Group of Aldolase. *Biochemistry*, 3, 67.
- 24) Fasman, G. D; Hoving, H. y Timasheff. 1970. Circular Dichroism of Polypeptide and Protein Conformations Films Studies. *Biochemistry*, 9. 17: 3316-3324.
- 25) Franks, F; Hatley, R. H. y Mathias, S. F. (1991). *Pharm. Technol. Bull*, 3: 40-44.
- 26) Gekko, K. y Morikawa, Y. (1981). Thermodynamics of polyol induced thermal stabilization of chymotrypsinogen. *J Biochem (Tokyo)*. 90:51-60.
- 27) Gross, C. y Watson, K. (1998). Transcriptional and translational regulation of major heat shock proteins and patterns of trehalose mobilization during hypertermic recovery in repressed and derepressed *S cerevisiae*. *Can J Microbiol*, 44:341-350.
- 28) Hammarström, P y Jonsson, B.H. (2005). Protein denaturation and the denaturated state. *Encyclop. life sci.* 1-7.
- 29) Henley, J. P. y Sadana, A. (1986). Deactivation theory. *Biotechnol. Bioeng.*, 73: 1277-1285.
- 30) Hopgood, M. F; Knowles, S. E; Bond, J. S. y Ballard, F. J. (1988). Degradation of native and modified forms of fructose-bisphosphate aldolase microinjected into HeLa cells. *Biochem. J.* 256: 81-88.
- 31) Horwich, A. (2002). Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J. Clin. Invest.* 110, 1221-1232.

- 32)** Jacob, M. y Schmid, F. X. (1999). Protein folding as a difussional Process. *Biochemistry*, 38: 13773-13779.
- 33)** Jacob, M; Geeves, M; Holtermann, G. y Schmid, F. X. (1999). Diffusional barrier crossing in a two-state protein reaction. *Nat. Struct. Biol*, 6: 923-926.
- 34)** Kajita, E; Moriwaki, J; Yatsuki, H; Hori, K; Miura, K; Iría, M. y Shiokawa, K. (2001). Quantitative Expression Studies of Aldolase A, B and C Genes in Developing Embryos and Adult Tissues of *Xenopus laevis*. *Mech. Of Develop*, 102: 283-287.
- 35)** Kamiyana, T; Sadahide, Y. y Gekko, K. (1999). Polyol-induced molten globule of cytochrome C: hydrophobic interaction stabilization. *Biochim Biophys Acta*, **1434**:44-57.
- 36)** Kawahara, W and Tandford, C. 1966. The Number of Polypeptide Chains in Rabbit Muscle Aldolase. *Biochemistry*, 5: 1578-1584.
- 37)** Kramers, H. A. (1940). Brownian motion in a field of force and the difusión model of chemical reactions. *Physica*, 7:284-304.
- 38)** Lins, R. D; Pereira, C. S. y Hünenberger, P. H. (2004). Trehalose-Protein Interacción in Aqueous Solution. *Prot: struc, func. and bioinf.* 55: 177-186
- 39)** Meaux, J. J. y Mitchell-Olds, T. (2003). Evolution of plant resistance at the molecular level: ecological context of species interactions. *Heredity* 91:345-352.
- 40)** Melo, E. P; Chen, L. Y; Cabral, J. M; Fojan, P; Petersen, S. B. y Otzen, E. D. (2003). Trehalose Favors a Cutinase Compact Intermediate Off-Folding Pathway. *Biochemistry*, 42: 7611-7617.
- 41)** Melo, E. P; Faria, T. Q; Martins, L. O; Goncalves, A. M. y Cabral, J. M. S. (2001). Cutinase unfolding and stabilization by trehalose and mannosylglycerate. *Prot. Struct. Function and genetics*. 42: 542-552.
- 42)** Meyerhof, O., y Lohmann, K., 1935. *Naturwissenschaften*, 23,850.
- 43)** Morano, K. A; Lui, P. C. y Thiele, D. J. (1998). Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, 1:97-203.

- 44)** Nakashima, K; Ohtsuki, M. y Tuboi, S. (1980). Membrane-bound fructose 1,6-biphosphate Aldolase: Catalytic Activitic & Mechanisms of desorption. *Tohoku J. Exp. Med*, 130: 143-152.
- 45)** Neves, M.J. y Francois, J. (1992) On the mechanism by which a heat shock induces trehalosa accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 288: 859-864.
- 46)** Pan, H. y Smith, D. L. (2003). Quaternary Structure of Aldolase Leads to Differences in Its Folding and Unfolding Intermediates. *Biochemistry*, 42, 5713-5721.
- 47)** Parrou, J.L., Teste, M.A. y Francois, J. (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Sccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology*, 143: 1891-1900.
- 48)** Puhlev, I; Guo, N; Brown, D. R. y Levine, F. (2001). Desiccation Tolerance in Human Cells. *Cryobiol*, 42: 207-217.
- 49)** Radford, S. y Dobson, C.M. (1999). From computer simulations to human disease: emerging themes in protein folding. *Cell* 97, 291-298.
- 50)** Ramírez-Silva, L; Ferreira, S. T; Nowak, T; Tuena de Gomez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (2001). Dimethylsulfoxide promotes K⁺-independent activity of pyruvate kinasa and the acquisition of the active catalytic conformation. *Eur. J. Biochem.* 268: 3267-3274.
- 51)** Ramírez-Silva, L; Oria, J. y Uribe, S. (2004). Funcion and structure of proteins in H₂O/cosolvent mixtures. *Encyclop surface colloid sc.* Hubbard, A., Ed; Marcel. Deker. Pp 1-15.
- 52)** Reinders, A; Thevelein, J. M; Boller, T; Wiemken, A. y DeVirgilio, C. (1997). Structural analysis of the subunits of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *S. cerevisiae* and their function during it heat shock. *Mol Microbiol* 24:687-695.
- 53)** Richard, H. T. y Foster, J. W. (2003) Acid resistance in E coli. *Adv Appl Microbiol* 52:167-71.

- 54)** Rudolph, R; Westhof, E. y Jaenicke, R. (1977). Kinetic analysis of the reactivation of rabbit muscle aldolase after denaturation with guanidine-HCl. FEBS-Lett 73:204-206.
- 55)** Rudolph, R; Engelhard, M y Jaenicke, R. (1976). Kinetics of refolding and reactivation of rabbit muscle aldolase after acid dissociation. Eur J Biochem 67:455-462.
- 56)** Sampedro, J. G; Guerra, G; Pardo, J. P. y Uribe, S. (1998). Trehalose-Mediated Protection of the Plasma Membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis* during Freeze-Drying and Rehydration. Cryobiol; 37: 131-138.
- 57)** Sampedro, J. G; Cortés, P; Muñoz-Clares, R. A; Fernández, A. y Uribe, S. (2001). Thermal inactivation of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Kluyveromyces lactis*. Protection by trehalose. Biochim. Biophys. Acta, 1544: 64-73.
- 58)** Sampedro, J. G; Muñoz-Clares R. A. y Uribe, S. (2002). Trehalose inhibits the H⁺-ATPase from *K lactis*: Dependence on viscosity and temperature. J. Bacteriol, 184: 4384-4391.
- 59)** Sampedro, J. G. y Uribe, S. (2004). Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. Mol. And Cell. Biochem. 256/257: 319-327.
- 60)** Shokri, M. M; Khajeh, K; Alikhajeh, J; Asoodeh, A; Ranjbar, B; Hosseinkhani, S. y Sadeghi, M. (2006). Comparison of the molten globule states of thermophilic and mesophilic α -amylases. Biophys. Chem. 122: 58-65.
- 61)** Sibley, J. A. y Lehninger, A. L. (1949). Determination of Aldolase in Animal Tissues. J. Biol. Chem. 173: 859-872.
- 62)** Singer, M. A. y Lindquist. (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of Trehalose. TIBTECH, 16: 460-468.
- 63)** Sleator, R. D. y Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS Microbiol, 26: 49-71.

- 64)**Stellwagen, E. y Schachman, H. K. (1962). The dissociation and reconstitution of aldolase. *Biochemistry*. 1, 6: 1056-1069.
- 65)** St-Jean, M; Lafrance-Vanasse, J; Liotard, B. y Sygusch, J. (2005). High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructosa-1,6-bisphosphate aldolase. *J. Biol. Chem.*. 280, 29: 27262-24270.
- 66)**Sygusch, J. y Beaudry, D. (1984). Catalytic Activity of Rabbit Skeletal Muscle Aldolase in the Crystalline State. *J. Biol. Chem*, 259 (16): 10222-10227.
- 67)**Tandford, C; Kawahara, K. y Lapanje, S. (1966). Proteins in 6 M Guanidine Hydrochloride. *J. Biol. Chem*, 241: 1921-1923.
- 68)** Timasheff, S. N. (1992). Water as ligand: preferential binding and exclusion of denaturants in protein unfolding. *Biochemistry*, 31: 9857-9864
- 69)**Timasheff, S. N. (1998). Control of enzyme stability and reactions by weakly interacting cosolvents: The simplicity of the complicated. *Adv Prot Chem*, 51:356-432.
- 70)**Timasheff, S. N. (2002). Protein hydration, thermodynamic binding and preferential hydration. *Biochemistry*, 41:13473-13482.
- 71)**Thomas, P.J; Qu, B. H y Pedersen, P.L. (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends. Biochem. Sci.* 20, 456-459.
- 72)**Uribe, S; Dalton, L. A; Samson P. y McIntyre, J. O. (1990). Interaction of spin-labeled aldolase with resealed erythrocytes. Abstract, ASMBM. (New Orleans, June 3-7)
- 73)**Van Dijck, P; Mascorro-Gallardo, J. O; De Bus, M; Royackers, K; Iturriaga, G. y Thevelein, J.M. (2002) "Truncation of *Arabidopsis thaliana* and *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase (TPS) unlocks high catalytic activity and supports high trehalose levels upon expression in yeast". *Biochemical Journal* 366: 63-71.
- 74)**Voit, E. O. (2003). Biochemical and genomic regulation of the trehalose cycle in yeast: review of observations and canonical model analysis. *J Theor Biol* 223:55-78.

- 75)** Vreeland, R. H. (1987). Mechanisms of halotolerance in microorganisms. *Crit Rev Microbiol* 14:311-356.
- 76)** Watanabe, M; Kikawada, T; Minagawa, N; Yukuhiro, F. y Okuda, T. (2002). Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J. Expe. Biol*, 205: 2799-2802
- 77)** Watanabe, M; Kikawada, T. y Okuda, T. 2003. Increase of internal ion concentration triggers trehalose synthesis associated with cryptobiosis in larvae of *Polypedilum vanderplanki*. *Journal of Experimental Biology*, 206: 2281-2286.
- 78)** Wedemeyer, W.J. y Scheraga, H. A. (2001). Protein folding: overview of pathways. *Encyclopedia of life sciences*. 1-9.
- 79)** Welsh, D. T. (2000). Ecological Significance of Compatible Solute Accumulation by Microorganisms: from Single Cells to Global Climate. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 263-290.
- 80)** Wera, S., De Schrijver, E., Geyskens, I., Nwaka, S. y Thevelein, J.M. (1999) Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 343: 621-626.
- 81)** Winderickx, J., de Windle, J.H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P. y Thevelein, J.M. (1996) Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control?. *Mol. Gen. Genet.*, 252: 470-482.
- 82)** Wiréhn, J; Carlsson, K; Herland, A; Persson, E; Carlsson, U; Svensson, M y Hammarström, P. (2005) Activity, Folding, Misfolding and Aggregation in Vitro of the Naturally Occurring Human Tissue Factor Mutant R200W. *Biochemistry*, 44: 6755-6763.
- 83)** Wu, R, y Racker, E. (1959) Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism III. Limiting factors of ascites tumour cells. *J Biol Chem* 234:1029-1035.
- 84)** Xiu, G. y Timasheff, S. N. (1997). The thermodynamic mechanism of protein stabilization by trehalose. *Biophys, Chem.*, 64: 25-43.

- 85)** Zhang, Z. y Smith, D. (1996). Thermal-induced unfolding domain in aldolase identified by amide hydrogen exchange and mass spectrometry. *Prot. Scie.* 5: 1282-1289.
- 86)** Zahringer, H., Holzer, H. y Nwaka, S. (1998) Stability of neutral trehalase during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, Tpk1 and Tpk2. *Eur. J. Biochem.*, 255: 544-551.