

00581

5
20

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CARACTERIZACION CINETICA DE LA BETAINA ALDEHIDO DESHIDROGENASA
DE HOJAS DE AMARANTO SOMETIDAS A DEFICIT DE AGUA

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS
(BIOQUIMICA)
PRESENTA

M. en C. ELISA MIRIAM VALENZUELA SOTO

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

Jurado asignado

Presidente: Dr. Mario Calcagno
Primer vocal: Dr. Rogelio Rodriguez
Segundo vocal: Dra. Adriana Ortiz
Tercer vocal: Dra. Alejandra Covarrubias
Secretario: Dr. Edgardo Escamilla
Primer suplente: Dr. Juan Pablo Pardo
Segundo suplente: Dr. Gabriel Iturriaga

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Bioquímica de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química bajo la dirección de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares.

Asesor: Dra. Rosario A. Muñoz Clares

Rosario Muñoz Clares

Sustentante: Elisa Miriam Valenzuela Soto

Elisa M. Valenzuela S.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha recibido los siguientes apoyos:

Beca para estudios de Doctorado CONACYT (CONACYT-53280) y beca de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (DGAPA).

Donativos: Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado de la UNAM (PADEP-DFQ-9141 y PADEP-DFQ-92) y CONACYT (1713-N9209).

Agradezco al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP) por proveernos de semilla de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*, tipo mercado) durante todo este trabajo.

Dedico esta tesis al Dr. Ezequiel Murillo Garcia

Para

Lydia y Gilberto

De manera especial quiero agradecer a

Dra. *Lidia Zamora de Buen* ya que sin su apoyo, regaños y ayuda en tantos aspectos durante estos años, no sé si hubiera logrado sobrevivir a la maestría y doctorado.

L.S. *Lina Zythelia Ortega Ojeda* todo lo que me dió durante estos ocho años y por permitirme ser parte de su familia.

Dr. *Fernando Ortega Lopez* y familia por tratarme siempre como a uno más de la familia.

Dra. *Rosario Muñoz Casas* por haberme recibido en su laboratorio, por el apoyo que me brindó para lograr llegar a este punto y por soportar mi manera de trabajar y de no trabajar.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, sobre todo al Biol. *Carlos Mujica Jiménez* por toda su ayuda técnica en la realización de varios de los experimentos que forman esta tesis.

De manera especial al Dr. *Enoch Nubíarez Rojas* ya que sin su apoyo estoy segura que no hubiera logrado llegar a este punto. De igual manera me ayudaron a lograrlo mis queridos compañeros *Daniel, Leticia y Carlos*.

INDICE

Contenido	pag.
I.- Introducción	1
II.- Antecedentes	
1.- Agua	3
2.- Solutos compatibles	4
3.- Glicina betaína	4
4.- Reacción catalizada por la betaína	
aldehído dehidrogenasa	6
5.- Aldehído deshidrogenasas	7
6.- Amaranto	8
III.- Objetivos	10
IV.- Materiales y Metodos	11
V.- Resultados	14
VI.- Discusión	26
VII.- Conclusiones y perspectivas	33
VIII.- Bibliografía	35

ABREVIATURAS

ALDH Aldehído deshidrogenasa

BA Betaína aldehído

BADH Betaína aldehído deshidrogenasa

CMO Colina monooxigenasa

DTNB Acido 5-5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)

DTT ditiotreitól

GB Clicina betaína

PEG polietilén glicol

RESUMEN

En el presente trabajo se muestra un estudio de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de hojas de amaranto sometidas a pérdida de agua, que incluye su purificación, caracterización cinética y la identificación de algunos de los aminoácidos esenciales para la actividad de esta enzima.

La actividad de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) se incrementa después de 4 horas de tratamiento de pérdida de agua con polietilén glicol. Se purificó la enzima a homogeneidad y se encontró por cromatografía de filtración molecular y por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS que tiene una masa molecular nativa de 125 kDa y una por subunidad de 63 kDa. La enzima es altamente específica para betaína aldehído; sin embargo, puede usar NAD^+ o NADP^+ como nucleótido. La reacción es irreversible aun a altas concentraciones de glicina betaína. La dependencia de la velocidad con respecto al pH indicó la existencia de dos grupos ionizables con valores de pK de 6.78 y 9.38 involucrados en la catálisis y/o en la unión de los sustratos. La temperatura óptima fué de 50°C con una energía de activación de la reacción entre 25 y 50°C de 61.8 KJ/mol. Estudios de modificación química sugieren la presencia de residuos de cisteína(s), histidina(s) y arginina(s) en el centro activo de la enzima. La BADH se activa por concentraciones relativamente bajas de K^+ , sacarosa y prolina, mientras que es inhibida por NH_4^+ , Na^+ y altas concentraciones de glicina betaína. Los iones divalentes no tuvieron ningun efecto sobre esta actividad enzimática.

Se analizó el mecanismo cinético de la reacción catalizada por la betaína aldehído deshidrogenasa mediante estudios de velocidad inicial en estado estacionario, inhibición por producto a bajas y altas concentraciones de sustratos e inhibición sin salida. De los dos productos de la reacción sólo el NADH produjo inhibición. Los resultados son consistentes con un mecanismo Iso Ordenado Bi Bi, en el cual

NAD⁺ es el primer sustrato que se une a la enzima y NADH el último producto en disociarse de ella. Este mecanismo ya había sido descrito teóricamente por Cleland (1963), pero no había sido encontrado en ninguna enzima; este es el primer trabajo publicado sobre dicho mecanismo basado en estudios de inhibición por producto.

La enzima es inhibida por altas concentraciones del sustrato betaína aldehído. Estudios de inhibición múltiple mostraron que la betaína aldehído se une de manera "sin salida" al complejo enzima-NADH. La inhibición por betaína aldehído es parcial, indicando que el NADH se puede disociar en algún grado del complejo enzima-NADH-BA. Los resultados de inhibición por producto a altas concentraciones de betaína aldehído muestran que el mecanismo sigue siendo Iso Bi Bi Ordenado.

SUMMARY

This work is a study about the enzyme Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8) from amaranth leaves subjected to water deficit. Purification, kinetic characterization and identification of some essential amino acid residues are described.

The activity of the BADH increased after 4 h of water loss treatment with polyethyleneglycol. This enzyme was purified to apparent homogeneity by two chromatographic steps. It has a native and subunit molecular mass of 125 kDa and 63 kDa respectively. The reaction is highly specific for betaine aldehyde, but can use NAD⁺ or NADP⁺ as nucleotide. The pH dependence of the velocity indicated the existence of two ionizable groups of macroscopic pK values of 6.78 and 9.38 involved in the catalysis and/or binding of the substrates. Chemical modification studies suggested the presence of essential cysteine(s), histidine(s), and arginine(s) residues. The enzyme was activated by relatively low concentrations of K⁺, sucrose, and proline, while it was inhibited by NH₄⁺, Na⁺, and high concentrations of glycine betaine. Divalent ions did not have any effect on the activity.

The kinetic mechanism of the reaction catalyzed by BADH was analyzed by steady state initial velocity, product inhibition, and dead-end inhibition studies. Only one product, NADH, gives inhibition. The results are consistent with an Iso Ordered Bi Bi Steady State mechanism in which NAD⁺ is the first substrate to bind at the enzyme and NADH is the last product to dissociate from it. To our knowledge, this is the first time that an Iso mechanism has been demonstrated by product inhibition studies, as predicted by Cleland (1963).

High betaine aldehyde concentrations inhibit the enzyme. Multiple inhibition studies showed that betaine aldehyde binds to enzyme-NADH complex in a dead-end fashion. The product inhibition at high betaine aldehyde concentrations showed that the mechanism is still Iso Ordered Bi Bi.

I.- INTRODUCCION

La disponibilidad de agua es usualmente la limitante más importante del crecimiento y supervivencia de una planta. En ocasiones una planta morirá o detendrá su crecimiento debido a un déficit en la cantidad de agua disponible, ya sea por falta de riego o por grandes cantidades de sales disueltas en el suelo.

A lo largo del desarrollo evolutivo, las plantas han desarrollado una gran cantidad de estrategias adaptativas para sobrevivir en escasez de agua, lo cual ha traído como consecuencia que muchas especies vegetales regulen su metabolismo y fisiología de diversas maneras en función de la cantidad de agua disponible (Kramer, 1969).

Se ha propuesto que las plantas al perder agua, sufren un cambio en su potencial hídrico (éste se vuelve más negativo) y como consecuencia a dicho cambio disparan una serie de mecanismos que le permiten evitar la pérdida de agua. Entre los mecanismos que se han propuesto están la acumulación de iones tales como K^+ , Na^+ y Cl^- así como la síntesis y acumulación de solutos orgánicos, entre ellos glicina betaína, prolina, β -alanina, sorbitol, manitol, glicerol y azúcares. Con estas estrategias la célula aumenta su potencial osmótico (lo hace más negativo) lo cual impide mayor pérdida de agua (Hanson y Hitz, 1982; Wyn Jones y Gorham, 1983). Recientemente se ha encontrado un grupo de proteínas que son sintetizadas en respuesta a estrés llamadas proteínas LEA, se han propuesto diversas funciones para ellas como por ejemplo mantener la estructura cuaternaria de las proteínas, secuestro de iones hacia la vacuola y unión de moléculas de agua a su superficie para evitar la pérdida de más agua durante el estrés hídrico (Bray, 1993).

La glicina betaína es uno de los principales solutos compatibles que se acumula bajo estrés salino o hídrico en plantas superiores, bacterias, algas y animales marinos (Wyn Jones y Storey, 1981; Yancey et al., 1982; Imhoff y Valera, 1984; Rhodes y Hanson, 1993). El paso final en la síntesis de

glicina betaína a partir de colina es catalizado por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (EC 1.2.1.8) (Hanson et al., 1985), de acuerdo a la siguiente secuencia de reacciones

Colina $\xrightarrow{\text{CMO}}$ betaína aldehído $\xrightarrow{\text{BADH}}$ glicina betaína

En plantas esta secuencia de reacciones se lleva a cabo mayoritariamente en el cloroplasto (Weigel et al., 1986).

Debido a la gran cantidad de organismos que sintetizan o acumulan glicina betaína en respuesta ya sea a la pérdida de agua o a altas concentraciones de sales, las enzimas involucradas en esta ruta han sido recientemente muy estudiadas. La betaína aldehído deshidrogenasa ha sido purificada a homogeneidad a partir de microorganismos (Nagasawa et al., 1976; Falkenberg y Strom, 1990; Mori et al., 1992), de hoja de espinaca (Arakawa et al., 1987; Pan, 1988; Weretilnyk y Hanson, 1989) y de soya (Lee y Cho, 1992). En hoja de espinaca y cebada sometida a estrés salino se encontró un aumento en la actividad de la enzima que se correlacionaba con un aumento en los niveles de su RNAm (Weretilnyk y Hanson, 1989; Arakawa et al., 1992).

Sin embargo, son escasos los estudios cinéticos sobre esta enzima y se desconocen los mecanismos por los cuales se regula su actividad, así como la composición del sitio activo. Por otra parte, dado que el amaranto es una planta que acumula glicina betaína en respuesta a la pérdida de agua (Gamboa, et al., 1991) nos interesamos en estudiar el efecto que sobre la actividad de BADH tuviera la pérdida de agua y en purificar y caracterizar a esta enzima a partir de de hojas de amaranto sometidas a pérdida de agua.

II.- ANTECEDENTES

II.1 AGUA

La disponibilidad de agua es uno de los principales factores que controlan la distribución de la vegetación y el tipo o especie de ésta. Debido a ello, la relación entre la planta y el agua ha sido de gran interés para muchos científicos durante generaciones. El agua constituye el 80-90% del peso fresco de una planta; una disminución en el contenido de agua de una planta casi siempre causa una disminución en la actividad fisiológica. A lo largo del desarrollo evolutivo las plantas han desarrollado una serie de estrategias adaptativas para sobrevivir en escasez de agua (Kramer, 1969); entre las cuales se han descrito estrategias morfológicas, anatómicas, fisiológicas y bioquímicas (Wyn Jones y Gorham, 1983; Morgan, 1984; Turner, 1986).

Las estrategias bioquímicas consisten en la acumulación de iones tales como K^+ , Na^+ , NO_3^- y Cl^- , en la acumulación de solutos orgánicos, también llamados solutos compatibles, entre ellos prolina, sacarosa, glicerol, glicina betaína, betaína alanina, polioles y ácidos orgánicos (Hanson y Hitz, 1982; Yancey *et al.*, 1982; Rhodes y Hanson, 1993) y en la síntesis de proteínas (proteínas LEA) (Bray, 1993). Los iones son acumulados principalmente en la vacuola, en donde pueden alcanzar altas concentraciones sin afectar actividades enzimáticas (Wyn Jones, 1983) y en el cloroplasto, en el caso particular del K^+ . Los solutos compatibles se acumulan principalmente en el citoplasma y en sus compartimentos (Hanson y Hitz, 1982; Rhodes y Hanson, 1993). Las proteínas LEA son un grupo de proteínas que se sintetizan en respuesta a diferentes tipos de estrés y que presentan diversas funciones, entre ellas secuestro de iones hacia la vacuola, protección de la estructura de proteínas y membranas y gran capacidad para unir moléculas de agua (Bray, 1993).

La función de estos iones y compuestos es la de proporcionar a la vacuola vegetal un aumento en su potencial

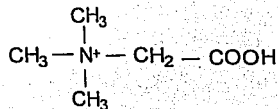
osmótico para evitar la pérdida de agua y, de esta manera, poder sobrevivir durante el período de escasez de agua.

II.2 SOLUTOS COMPATIBLES

El término de solutos compatibles fue introducido por Borowitzka y Brown (1974) para describir sustancias no inhibitorias y con función metabólica que se acumulan cuando la planta está sometida a bajos potenciales de agua. En algunos casos se ha propuesto que los solutos compatibles no contribuyen de manera sustancial al incremento en el potencial osmótico y que probablemente su función se ejerza a nivel de compatibilidad de estos solutos con la estructura y función de las macromoléculas (Wyn Jones et al., 1977; Wyn Jones, 1984). Esta compatibilidad de los osmolitos resulta primeramente de la ausencia de efectos perturbadores sobre las interacciones macromolécula-solvente (Yancey et al., 1982), ya que estos solutos son excluidos de la superficie de la proteína y su esfera de hidratación inmediata, por lo tanto estabilizan las estructuras de plegamiento de la proteína (Rhodes y Hanson, 1993). También se ha propuesto que los solutos compatibles, incluyendo a la glicina betaína, pueden alterar las propiedades termodinámicas de las membranas (Rudolph et al., 1986).

II.3 GLICINA BETAÍNA

El soluto compatible glicina betaína (N,N,N-trimetil glicina)



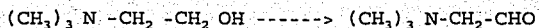
es un compuesto cuaternario de amonio que se acumula en una amplia variedad de plantas superiores, bacterias, cianobacterias y algas en respuesta a estrés de agua y/o salino (Wyn Jones y Storey, 1981; Yancey, 1982; Imhoff y Valera, 1984; Reed et al., 1984; Gamboa et al., 1991; Rhodes y

Hanson, 1993). Se ha propuesto que este compuesto actúa como un osmótico no tóxico, localizado preferencialmente en el citoplasma y en el cloroplasto de las células vegetales (Robinson y Jones, 1986; Schröppel-Meier y Kaiser, 1988). Se han descrito una gran cantidad de posibles funciones para este compuesto, entre las que se pueden enumerar las siguientes: (1) protección parcial de enzimas aisladas de plantas superiores y cianobacterias halofílicas contra la inhibición causada por NaCl y KCl (Wyn Jones y Storey, 1981; Manetas et al., 1986; Rhodes y Hanson, 1993), (2) compartimentalización de iones (Ahmad et al., 1988), (3) estabilización de membranas (Jolivet et al., 1983; Rudolph et al., 1986), (4) replicación del DNA a nivel bacteriano (Meury, 1988), (5) protección de las membranas de los tilacoides contra el estrés por congelamiento (Coughlan y Heber, 1982), (6) protección de cloroplastos aislados, evitando la pérdida de actividad fotosintética durante el almacenamiento (Rhodes y Hanson, 1993). Dado que se han descrito muchas funciones para la glicina betaína, se han realizado varios estudios sobre las condiciones en las cuales se acumula y qué papel puede tener en el modelo de estudio. Su síntesis ha sido menos estudiada, pero hasta la fecha existen algunos estudios sobre las dos últimas enzimas involucradas en la vía de síntesis de la glicina betaína.

Por estudios *in vivo* con trazadores radiactivos se ha encontrado que la glicina betaína se sintetiza por dos pasos de oxidación de la colina, vía el intermediario betaína aldehído (Weigel et al., 1986)

colina --CMO--> betaína aldehído --BADH-> glicina betaína

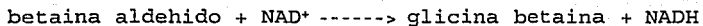
El primer paso es catalizado por una colina monooxigenasa dependiente de ferredoxina (CMO), enzima soluble localizada en el estroma del cloroplasto (Lerma et al., 1988; Brouquisse et al., 1989). Esta enzima convierte a la colina en el aldehído, el cual es la forma dominante en solución acuosa



El segundo paso en la síntesis de la glicina betaína es catalizado por la betaína aldehído deshidrogenasa dependiente de piridín nucleótido (Weretilnyk y Hanson, 1989; Arakawa et al., 1990; Falkenberg y Strom, 1991).

II.4 REACCION CATALIZADA POR LA BETAINA ALDEHIDO DESHIDROGENASA

Esta enzima (BADH, EC 1.2.1.8 betaina aldehído:NAD⁺ oxidorreductasa) cataliza el último paso en la oxidación de la colina en la ruta biosintética del soluto compatible glicina betaína, de acuerdo a la siguiente reacción (Hanson et al., 1985):



Esta reacción se lleva a cabo mayoritariamente en el cloroplasto, pero en espinaca se ha encontrado también una isoforma citoplasmática (Weigel et al., 1986; Pan, 1988), la cual contribuye muy poco a la concentración final de glicina betaína formada. Esta enzima ha sido purificada a homogeneidad en plantas (Arakawa, et al., 1987; Pan, 1988; Weretilnyk y Hanson, 1989; Lee y Cho, 1992), en bacterias (Nagasawa et al., 1976; Falkenberg y Strom, 1990; Mori et al., 1992) y en hongos (Mori et al., 1980). En espinaca y en cebada se encontró que bajo condiciones de estrés salino aumenta el RNAm de esta proteína (Weretilnyk y Hanson, 1989; Arakawa et al., 1992). Se ha reportado que la BADH es altamente específica para betaína aldehído (BA) (Weretilnyk y Hanson, 1989; Falkenberg y Strom, 1990), no siendo igual para el nucleótido, ya que puede usar tanto NAD⁺ como NADP⁺, aun cuando presenta mayor afinidad por NAD⁺. En espinaca se encontró que la enzima activa es un dímero con una masa molecular de 120 kDa aproximadamente (Weretilnyk y Hanson, 1990); en bacterias la BADH activa es un

tetrámero de aproximadamente 216 kDa (Falkenberg y Strom, 1990).

A partir del cDNA se dedujo la secuencia aminoácida de la enzima de hoja de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1989), de *E. coli* (Boyd et al., 1991) y de betabel (McCue y Hanson, 1992). Se encontró una región de diez aminoácidos altamente conservada entre las aldehído deshidrogenasas que se compararon, Val-Thr-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Lys-Ser-Pro, así como también un residuo de cisteína localizado a 34 residuos del decapeptido (Weretilnyk y Hanson, 1990) por lo cual se postula que estos residuos forman parte del sitio activo de esta proteína.

Sin embargo, en el momento de iniciar este trabajo existía muy poca información acerca de las características cinéticas y de regulación de esta enzima. Se ha reportado que la BADH de microorganismos sigue un mecanismo cinético Ping Pong (Mori et al., 1980; Falkenberg y Strom, 1990). Este mecanismo difiere del que siguen otras aldehído deshidrogenasas estudiadas, en las cuales el mecanismo cinético es secuencial.

II.5 ALDEHIDO DESHIDROGENASAS

Las aldehído deshidrogenasas dependientes de NAD⁺ son enzimas con poca especificidad de sustrato y que se encuentran ampliamente distribuidas en tejidos animales. Ellas han sido extensivamente estudiadas principalmente por su papel en el metabolismo del etanol y se han llevado a cabo muchas investigaciones en hígado de mamíferos, principalmente en rata (Lindahl y Evces, 1984; Simpson et al., 1985). La aldehído deshidrogenasa ha sido parcial o totalmente purificadas a partir de diversas fuentes: hígado de caballo (Tu-G-C y Weiner, 1988), de oveja (Hart y Dickinson, 1985; Kitson et al., 1991) y ratón (Algar y Holmes, 1985), de cerebro de rata (Nilsson y Tottmar, 1985) y humano (Ryzlak y Pietruzko, 1987) así como de testículos de rata (Bedino et al., 1990).

Estas enzimas están usualmente presentes en la mitocondria y el citoplasma bajo diferentes formas y pueden ser divididas en dos clases, una con alta Km para el acetaldehído (en el orden milimolar) y la otra con baja Km para el acetaldehído (en el orden micromolar). Las ALDH tienen una amplia especificidad de sustrato y pueden utilizar tanto NAD⁺ como NADP⁺ como coenzima. En la mayoría de los casos la enzima es tetramérica.

El mecanismo cinético de varias aldehído deshidrogenasas estudiadas es secuencial ordenado, siendo NAD⁺ el primer sustrato que se une a la enzima y NADH el último en liberarse (Hart y Dickinson, 1982; Dickinson, 1989). Se ha propuesto que existe un residuo de cisteína en el sitio activo de la enzima esencial para la actividad y que este grupo SH es el responsable de la oxidación del aldehído (Tu-G-C y Weiner, 1988 a y b; Kitson, 1985; Kitson et al., 1991).

En plantas superiores se han aislado pocas aldehído deshidrogenasas, en comparación a las ALDH de mamíferos, y por tanto es poco lo que se conoce sobre estas enzimas en plantas. La ALDH de mitocondrias de papa y chícharo son muy semejantes en sus características a la de mamíferos (Asker y Davies, 1985).

II.6 AMARANTO

El amaranto es un cultivo muy antiguo, su presencia en México data desde el año 4000 AC en Tehuacán, Puebla, por lo que es uno de los cultivos para alimento más antiguo que se conoce. Este grano fue un importante nutriente para las civilizaciones azteca, maya e inca. Se usó para preparar un pan especial utilizado en las ceremonias religiosas y por esta razón su cultivo fue prohibido por los españoles cuando llegaron a América (Teutonico y Morton, 1985).

El amaranto es una planta C₄ que acumula glicina betaína en las hojas maduras, como una primera respuesta al déficit hídrico (Gamboa et al., 1991). Cuando la planta de amaranto se somete a períodos de estrés hídrico no muy severos es decir un

contenido relativo de agua (CRA) del 60% ($\Psi = 1 \text{ MPa}$), es capaz de producir semilla. Además, esta planta presenta una rápida recuperación de la turgencia (15 minutos aproximadamente en plantas de invernadero) después del tratamiento de pérdida de agua. Cuando el déficit hídrico es muy grande es decir un CRA de menos del 50%, la planta deja de sintetizar glicina betaina y acumula prolina (Gamboa et al., 1991).

El amaranto es de importancia agronómica ya que tanto la semilla como la hoja contienen una alta concentración de proteína de alta calidad, superior a la de soya y pescado, debido especialmente a su alto contenido en lisina (Downtown, 1973) y en aminoácidos con azufre (Segura et al., 1992). Debido a ello este cultivo ha recibido considerable atención como un suplemento de cereales y legumbres para evitar la desnutrición proteica (Valades-Rodríguez et al., 1993).

III.- OBJETIVO

Este trabajo tuvo como objetivo general caracterizar el comportamiento cinético e identificar residuos aminoácidos que participen en la catálisis de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de hojas de amaranto sometidas a pérdida de agua.

Para lograr este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Purificar a homogeneidad la betaína aldehído deshidrogenasa de hojas de amaranto sometidas a pérdida de agua.
- 2.- Investigar el mecanismo cinético de estado estacionario de esta enzima.
- 3.- Estudiar la regulación de la actividad enzimática por diferentes iones y metabolitos.
- 4.- Identificar algunos de los residuos aminoácidos del sitio activo que participen en la catálisis.
- 5.- Investigar los posibles cambios en la actividad de la enzima en respuesta al déficit de agua.

III.- MATERIALES Y METODOS

La mayoría de los métodos que se utilizaron en este trabajo están descritos en los artículos publicados; aquí sólo se describen aquellos que no están contenidos en los artículos.

Plantas.- Se utilizaron hojas maduras de *Amaranthus hypochondriacus* L. sometidas a pérdida de agua. Las plantas se cultivaron en macetas bajo condiciones de invernadero tal como se describe en el artículo número 1. Durante este trabajo se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* L. donadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP).

Estudios de modificación química.- La enzima pura se dializó frente a un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 8.0, bajo atmósfera de nitrógeno durante toda la noche; se separaron alícuotas también bajo atmósfera de nitrógeno y se congelaron a -70°C . Alícuotas de la enzima (5 μg) se incubaron con diferentes concentraciones de DTNB, tal como se muestra en cada figura, durante 8 minutos, y se tomaron muestras a los 0.5, 1, 2, 4 y 8 minutos. La reacción de inactivación se detuvo por dilución (1:25) en el medio de ensayo.

Estudios de protección por sustratos y productos.- Protección por NAD^+ y NADH. A la mezcla de inactivación ($[\text{DTNB}] = 600 \mu\text{M}$) se le adicionaron diferentes concentraciones de NAD^+ y NADH, tal como se muestra en las figuras, tomándose alícuotas cada 0.5, 1, 2 y 4 minutos, a las que se les midió la actividad remanente.

Protección por BA y GB. La enzima se incubó con las diferentes concentraciones de BA y GB, así como las mezclas de $\text{BA} + \text{NAD}^+$, $\text{BA} + \text{NADH}$, $\text{GB} + \text{NAD}^+$ y $\text{GB} + \text{NADH}$ durante 1 minuto, posteriormente se le añadió DTNB para una concentración final de 600 μM y se incubó por 5 minutos a 30°C y enseguida se midió la actividad remanente a cada uno de los tratamientos.

Inhibición por sustrato.- Se utilizaron concentraciones subsaturantes de NAD^+ (20-100 μM) y concentraciones de BA

saturantes para el sitio activo e inhibitorias de la actividad (0.2-50 mM). El experimento se hizo manteniendo fija la concentración de uno de los sustratos y variando la del otro.

Inhibición múltiple. - Se mantuvo constante y subsaturante la concentración de NAD⁺ (40 μM), variable la concentración de BA (0.75-6 mM) y fija variable la concentración de NADH (0-100 μM).

Análisis de datos. - Las constantes de inactivación aparente de pseudo primer orden fueron calculadas por un ajuste de regresión no lineal de los datos experimentales a una ecuación exponencial sencilla (ecuación 1), usando el programa de regresión no lineal escrito por R.J. Leatherbarrow (Enzfitter, Elsevier-BIOSOFT).

$$E/E_0 = e^{-kt} \quad (1)$$

donde E es la actividad remanente de BADH al tiempo t, E₀ es la actividad inicial, y k es la constante de inactivación de pseudo-primer orden.

Los datos de protección fueron analizados por gráficas de k versus la concentración de ligando de acuerdo a Renosto, et al. (1987). Los datos fueron ajustados por regresión no lineal a la ecuación 2

$$\Delta K = \frac{\Delta K_{\max} [L]}{K_D + [L]} \quad (2)$$

donde ΔK = (k en ausencia del ligando) - (k en presencia de una concentración experimental de ligando); ΔK_{max} = (k en ausencia de ligando) - (k en presencia de concentración saturante de ligando), L es NAD⁺ o NADH y K_D es la constante de disociación del ligando del complejo E-NAD⁺ o E-NADH.

Los datos de velocidad inicial e inhibición por producto obtenidos a concentraciones altas de BA y bajas concentraciones de NAD⁺ fueron analizados como se indica en el

artículo 1 para el caso de estudios cinéticos a concentraciones subsaturantes de BA.

A partir de los datos de los experimentos de doble inhibición se calculó el factor de interacción β entre NADH y BA usando la ecuación descrita por Cleland (Northrop y Cleland, 1974)

$$1/v_x = (1/v_0) (1-\beta) \quad (3)$$

donde $1/v_x$ es la coordenada vertical del punto en el que se cruzan las líneas en la gráfica de $1/v$ versus $1/[\text{inhibidor variable}]$ y v_0 es la velocidad inicial en ausencia de inhibidores.

IV.- RESULTADOS

Al igual que en el caso de Materiales y Métodos en esta parte del trabajo sólo se muestran los resultados que no fueron incluidos en los artículos.

Modificación química.- La BADH de hojas de amaranto es inactivada por incubación con DTNB, indicando la posibilidad de que un grupo sulfhidrilo esté involucrado en la unión de los sustratos o en la catálisis. Con el fin de caracterizar esta inactivación se llevaron a cabo experimentos de modificación a diferentes concentraciones de DTNB.

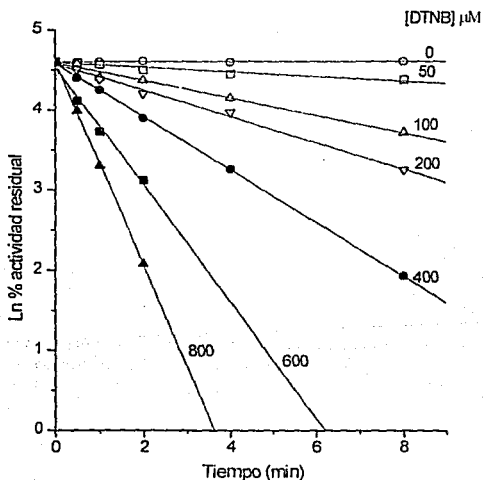


Fig. 1. Efecto de la concentración de DTNB sobre la actividad de la BADH con respecto al tiempo.

La enzima pura (5 µg) se incubó con DTNB en un intervalo de concentración de 0-800 µM durante 8 minutos y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. La gráfica del logaritmo natural del porcentaje de actividad remanente vs tiempo muestra que la reacción de inactivación es dependiente de la

concentración de DTNB y del tiempo (Fig. 1). En ausencia de DTNB no hay pérdida de la actividad durante el tiempo de incubación (Fig. 1). La reacción de inactivación de la BADH de hoja de amaranto por DTNB sigue una cinética de pseudo primer orden. Una gráfica de los recíprocos de la constante

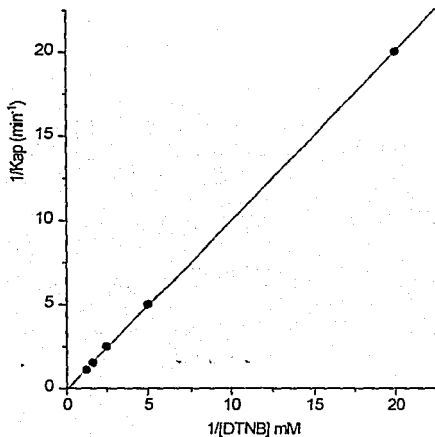
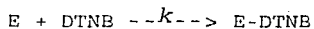


Fig. 2. Dobles recíprocos de K aparente, determinada de la pendiente de las líneas de inactivación, y [DTNB].

de inactivación de pseudo primer orden contra la concentración del inactivador es lineal y pasa a través del origen (Fig. 2), consistente con una reacción que ocurre al colisionar el inactivador con la enzima. El mecanismo de inactivación es por tanto



donde E es la enzima libre, E-DTNB es el complejo covalente inactivo y k es la constante de inactivación de segundo orden. Dado que la [DTNB] es mucho más grande que la

concentración de enzima, se puede considerar que la concentración de DTNB no cambia a lo largo del tiempo en que

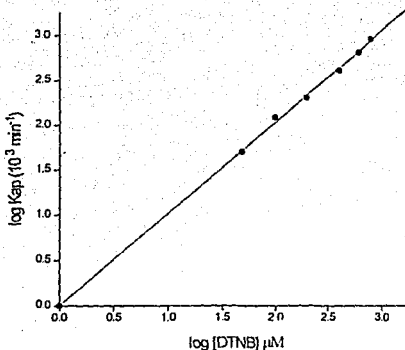


Fig. 3. Logaritmo de K aparente, calculada de la pendiente de las líneas de inactivación versus $\log [DTNB]$.

se está midiendo la reacción. La constante de velocidad de inactivación (k_{ap}) es, en efecto, una constante de inactivación de pseudo-primer orden. Se calculó una constante de velocidad de segundo orden de $18.33 \pm 0.03 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 2). Una gráfica del logaritmo de la constante de inactivación de pseudo primer orden contra el logaritmo de la $[DTNB]$ es lineal con una pendiente de 1.00 ± 0.06 , consistente con un mecanismo de reacción de primer orden para DTNB (Fig. 3).

Con el fin de determinar si la inactivación por reactivos específicos para grupos sulfhidrilo es realmente el resultado de modificación química de grupos tiol, la enzima se inactivó con DTNB y después se trató con DTT (5 mM) por 30 minutos. La pérdida de actividad causada por DTNB pudo ser revertida por la adición de DTT.

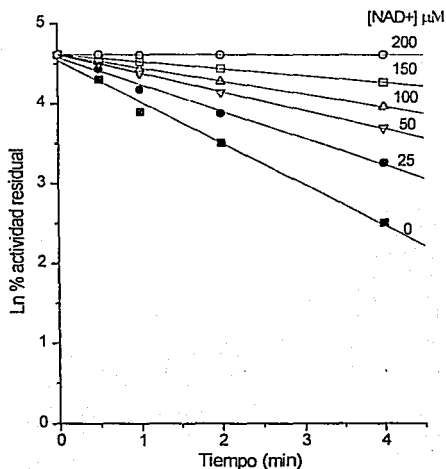


Fig. 4. Protección de la actividad de BADH por NAD^+ contra la inactivación por DTNB.

Protección de la inactivación por reactantes.- Con el fin de determinar si ese grupo(s) sulfhidrilo(s) está en o cerca del sitio activo de la enzima se realizaron experimentos de protección por sustratos y productos. En presencia de diferentes concentraciones de NAD^+ , incluidas en el medio de preincubación con enzima y DTNB ($600 \mu\text{M}$), la velocidad de inactivación decrece como resultado de un proceso de protección (Fig. 4). La protección es completa a $200 \mu\text{M}$ NAD^+ . La gráfica de la constante aparente de velocidad de inactivación contra la concentración de NAD^+ muestra que el proceso de protección exhibe una dependencia hiperbólica de la concentración de NAD^+ (Fig. 5). A partir de estos datos se calculó la constante de disociación del complejo E- NAD^+ , tal y como se indica en Materiales y Métodos, la cual es de $28.4 \pm 2.6 \mu\text{M}$. Este valor es muy cercano al valor de K_{ia} calculado a

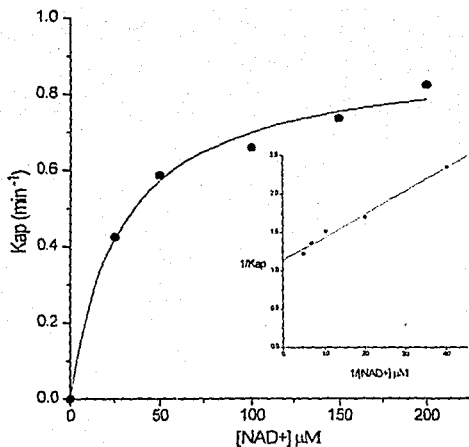


Fig. 5. Dependencia del efecto protector con respecto a la concentración de NAD⁺. *Inserto* dobles recíprocos de la Kap y la [NAD⁺].

partir de estudios de velocidad inicial en estado estacionario, que fue de $40.1 \pm 6.1 \mu\text{M}$ (artículo 2).

Cuando se llevaron a cabo los experimentos de protección en presencia de concentraciones variables de NADH, la protección fue completa a $360 \mu\text{M}$ NADH (Fig. 6). La velocidad de inactivación mostró también una dependencia hiperbólica con respecto a la concentración de NADH (Fig. 7).

La constante de disociación para el complejo E-NADH calculada a partir de estos datos es $230.1 \pm 26 \mu\text{M}$. Este valor no está muy cercano al valor de la K_{iQ} ($50.7 \pm 6.3 \mu\text{M}$) calculada por estudios de inhibición por producto (artículo 2). Esta discrepancia se debe principalmente al mecanismo Iso que sigue la reacción y que afecta los valores de K_{iA} y K_{iQ} .

La presencia de betaína aldehído ($200 \mu\text{M}$) o glicina betaína ($200 \mu\text{M}$) proporcionaron una protección parcial del

31.3%. Sin embargo, la presencia de 50 μM NAD^+ y 200 μM BA proporcionaron una protección completa, la cual no se observa con 50 μM de NADH y 200 μM o 2 mM de glicina betaína.

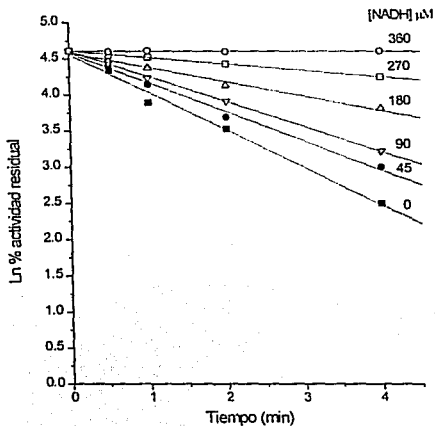


Fig. 6. Cinética de protección de la actividad de BADH por NADH contra la inactivación por DTNB.

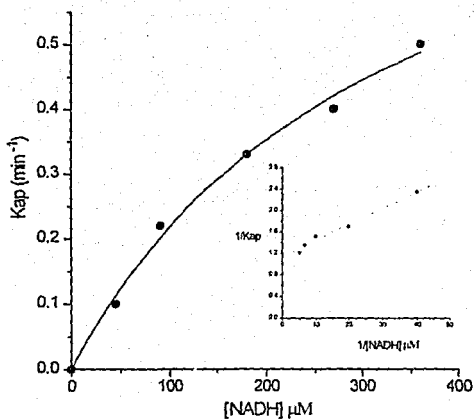


Fig. 7. Dependencia del efecto protector con respecto a la concentración de NADH. *Inserto* dobles recíprocos de la K_{ap} y la $[NADH]$.

Estudios de inhibición por sustrato.- La BADH de hojas de amaranto sigue una cinética Michaeliana; sin embargo, está sujeta a inhibición por su sustrato betaína aldehído (BA), la cual es dependiente de la concentración del otro sustrato NAD^+ (artículo 1). Se decidió hacer un estudio más completo de la inhibición por BA, con el objeto de profundizar en el mecanismo cinético de esta enzima.

Con el uso de concentraciones fijas de BA saturantes en su papel como sustrato (0.6 a 50 mM de BA, al menos 10 veces la $K_{M(BA)}$ estimada por los estudios de velocidad inicial llevados a cabo a concentraciones subinhibitorias de BA), y concentraciones variables de NAD^+ en un intervalo de 20 a 100 μM , se observó un patrón de inhibición paralelo (Fig. 8),

FALTA PAGINA

No. a la

21

primer sustrato que se une a la enzima (artículo 2), este resultado excluye los modelos de inhibición por sustrato en los cuales BA se une a la enzima libre en competencia directa con NAD⁺. La inhibición observada es parcial, como se indica por la falta de linealidad en el regráfico de intersectos (Fig. 8) y por la curvatura en la gráfica de Dixon de los mismos datos (Fig.9).

Inhibición doble.- El patrón de inhibición observado, para el sustrato, puede ser explicado por la combinación de BA con el complejo E-NADH para formar el complejo E-NADH-BA o con los complejos centrales, de tal manera que inhíba ya sea la catálisis o la liberación de productos. Para aclarar este punto, se investigó la inhibición por altas concentraciones de BA en presencia de NADH como producto inhibidor, con el fin de probar la formación de un complejo inhibitorio "sin salida" E-NADH-BA. Si BA provoca inhibición por unión al complejo E-NADH, la adición de NADH debe incrementar los niveles de este complejo y por lo tanto acentuar la inhibición por sustrato.

Los experimentos se llevaron a cabo a concentraciones fijas de NAD⁺ (100 μ M) y concentraciones variables e inhibitorias de BA (0.75-6.0 mM). El NADH, como producto inhibidor, se varió de 0 a 100 μ M. Las gráficas de $1/v$ versus [BA] a concentraciones fijas variables de NADH (Fig. 10) y las gráficas de $1/v$ versus [NADH] a concentraciones fijas variables de BA (Fig.11) muestran un patrón intersectante. El punto de intersección se encuentra por encima del eje horizontal y a la izquierda del eje $1/v$. NADH produce el incremento esperado en la inhibición por el sustrato BA. El valor de β , coeficiente de interacción entre los dos inhibidores, calculado a partir de esos datos fue de 0.98 ± 0.06 . Este dato es congruente con un mecanismo ordenado, ya que en este caso el valor de β no debe exceder de 1 (Northrop y Cleland, 1974). Además, el patrón observado y el valor de β indican que la inhibición de BADH por BA y NADH es sinérgica y los inhibidores no son mutuamente excluyentes.

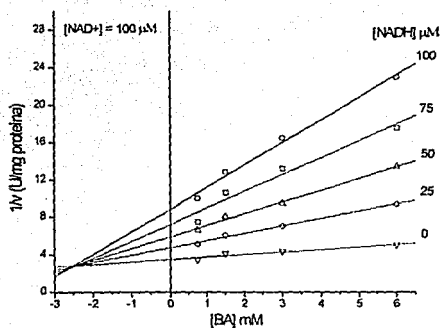


Fig. 10 Cinética de doble inhibición por BA y NADH de la reacción catalizada por la BADH. $1/v$ versus [BA] a concentraciones variables de NADH.

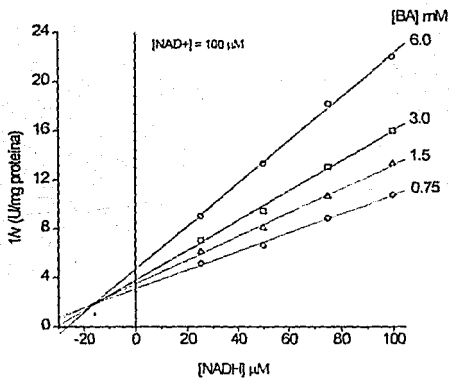


Fig. 11 Cinética de doble inhibición por BA y NADH sobre la actividad de la BADH. $1/v$ versus [NADH].

Los regráficos de los interceptos *versus* la concentración de BA y NADH fueron lineales en ambos casos.

Inhibición por producto.- La inhibición parcial por BA podría explicarse por la liberación de NADH del complejo E*-NADH-BA que daría lugar a una ruta alterna de reacción al unir NAD⁺. En este caso, el paso de isomerización entre E* y E no se daría entre formas libres de la enzima, por lo que no se debe reflejar en la ecuación de velocidad en presencia de productos y el mecanismo cinético de la reacción no aparecería como Iso. En otras palabras, la inhibición de NADH con respecto a NAD⁺ sería competitiva. Con el fin de determinar si la enzima sigue exhibiendo un mecanismo Iso bajo estas condiciones, se estudió el patrón de inhibición por NADH a diferentes concentraciones de NAD⁺ (25-200 μM) y a altas concentraciones fijas inhibitorias de BA (0.6 mM).

Como se observa en la Fig. 12 se tiene un patrón de inhibición mixto, semejante al observado en estudios

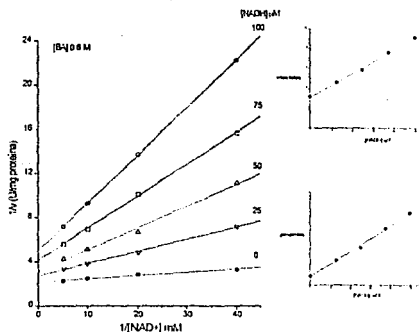


Fig. 12 Cinética de la inhibición por producto a altas concentraciones del sustrato BA. *Inserto* gráfico de interceptos y pendientes vs [NADH].

de inhibición por producto a bajas concentraciones de sustrato. Por lo tanto, se puede decir que a altas concentraciones de sustrato el mecanismo Iso sigue operando y la inhibición parcial por BA se debe a un mecanismo, por el momento desconocido, diferente al encontrado hasta ahora en estos casos de liberación del producto del complejo E-Producto-Sustrato inhibitor.

V.- DISCUSION

Possible regulación fisiológica de la BADH

Al momento de iniciar este trabajo se había propuesto (Pan, 1988) que la BADH de espinaca no incrementaba su actividad en respuesta al estrés hídrico en hoja de espinaca. En el caso de la BADH de amaranto se encontró que la actividad de la enzima se incrementa en respuesta a la pérdida de agua. Sin embargo, no sabemos si este incremento en la actividad es resultado de la activación de la enzima preexistente o de una síntesis de novo de la proteína. Tanto en espinaca como en cebada se ha encontrado un aumento en el RNAm de la proteína como respuesta al estrés salino e hídrico (Weretilnyk y Hanson, 1989; Arakawa et al., 1992) y posiblemente éste sea también el caso de la BADH de amaranto. Sin embargo, dado que el aumento en la actividad de la BADH es relativamente rápido (2 hs.), no se puede descartar la posibilidad de que haya una activación de la proteína por alguna señal de pérdida de agua, un cambio de volumen celular o de la concentración de ácido abscísico, por ejemplo. No obstante, mientras el artículo 1 estaba en revisión para su publicación, se reportó que en cebada se observaba un incremento en la actividad de la enzima en respuesta a la pérdida de agua (Arakawa, 1992).

La BADH de hoja de amaranto parece ser muy similar a la enzima de otras plantas, ya que tiene una masa molecular muy semejante a la reportada para espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1989). La forma activa es un homodímero con un M de 125 kDa, pero diferente a la de microorganismos la cual es tetramérica en su forma activa (Mori et al., 1980; Falkenberg y Strom, 1990; Mori et al., 1992).

La betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de amaranto sigue una cinética Michaeliana pero sufre inhibición por el sustrato BA, la cual es dependiente de la concentración del otro sustrato (NAD⁺). Probablemente esta inhibición no tenga relevancia a nivel fisiológico, ya que es poco probable que

se alcancen concentraciones tan altas de BA en el cloroplasto como para causar esta inhibición. Este tipo de inhibición parece ser común en las aldehído deshidrogenasas (Hart y Dickinson, 1982). La enzima es ligeramente activada por K^+ cuando las concentraciones de sustratos son altas, pero de manera significativa cuando las concentraciones de sustratos son bajas; esto podría tener significado fisiológico, ya que bajo condiciones de estrés el cloroplasto acumula altas concentraciones de potasio (Hanson y Hitz, 1982; Schröppel-Meier y Kaiser, 1989), por lo que este ión podría jugar un papel en la regulación de la actividad de la enzima. De igual manera, prolina y sacarosa son activadores de esta enzima, y como en el caso del potasio, la activación depende de las concentraciones de sustrato presentes en el ensayo. Previamente reportamos que bajo condiciones de estrés hídrico, las hojas de amaranto acumulan prolina (Gamboa et al. 1991) y sacarosa (Letechipía y Murillo comunicación personal). Bajo condiciones de estrés, el potasio, la prolina y la sacarosa podrían estar jugando un papel importante en la regulación de la actividad de esta enzima.

Modificación química de la BADH por DTNB

A pesar de que cuando se inició este trabajo ya se conocía la secuencia de aminoácidos, de la enzima de espinaca deducida a partir del cDNA (Weretilnyk y Hanson, 1990), no se tenía información acerca de los residuos de aminoácidos que podían estar involucrados en la catálisis y/o en la unión de los sustratos. En las diferentes betaína aldehído deshidrogenasas conocidas existe un residuo de cisteína muy conservado (Weretilnyk y Hanson, 1990; Boyd et al., 1991; McCue y Hanson, 1992), el cual es un candidato idóneo para estar en el sitio activo de la BADH. Igualmente en todas las ALDHs se ha encontrado una cisteína esencial para la actividad (Feldman y Weiner, 1972; Dickinson, 1989; Hempel, et al., 1993), la cual se ha propuesto que está involucrado en la catálisis formando un tiohemiacetal intermediario con el aldehído (Jakoby, 1963).

Por lo tanto, se consideró de interés determinar si este aminoácido está involucrado en la actividad catalítica de la BADH de amaranto. El DTNB, un reactivo específico para grupos sulfhidrilos, fué capaz de inactivar a la enzima. Esta inactivación fue caracterizada y se encontró que efectivamente la BADH de hojas de amaranto tiene residuos de cisteína esenciales para la actividad. Aún más, el efecto protector de ambos nucleótidos solos y en combinación con el otro sustrato o producto apoyan la posibilidad de que estos grupos sulfhidrilo estén en/o cerca del sitio activo.

La protección que ejercen los sustratos o productos de una reacción catalizada enzimáticamente frente a la inactivación de la enzima por reactivos específicos de grupo, se ha utilizado con relativa frecuencia, para determinar en forma indirecta, la unión de estos ligandos al sitio activo de la enzima en cuestion (Renosto et al., 1987). Nosotros aprovechamos la protección que NAD^+ y NADH ofrecen a BADH frente a la inactivación de la BADH por DTNB para determinar la constante de disociación de estos compuestos de la enzima libre. Dado que el mecanismo cinético es Iso, estas constantes de disociación no pudieron ser determinadas por estudios cinéticos.

Cinética de estado estacionario

A pesar del gran interés que existe en la betaína aldehído deshidrogenasa por su papel en la síntesis de glicina betaína, poco es lo que se conoce sobre el mecanismo cinético de esta enzima.

Debido a que la reacción catalizada por la BADH de amaranto es irreversible aún a altas concentraciones de glicina betaína, como es el caso para otras aldehído deshidrogenasas (Mac Gibbon, et al., 1977; Hart y Dickinson, 1982; Dickinson, 1989), los estudios cinéticos acerca de esta enzima estuvieron limitados a estudios de velocidad inicial en la dirección de formación de glicina betaína y NADH , en ausencia y presencia de inhibidores. Además sólo un producto causó inhibición (NADH). Esto complicó el establecimiento del

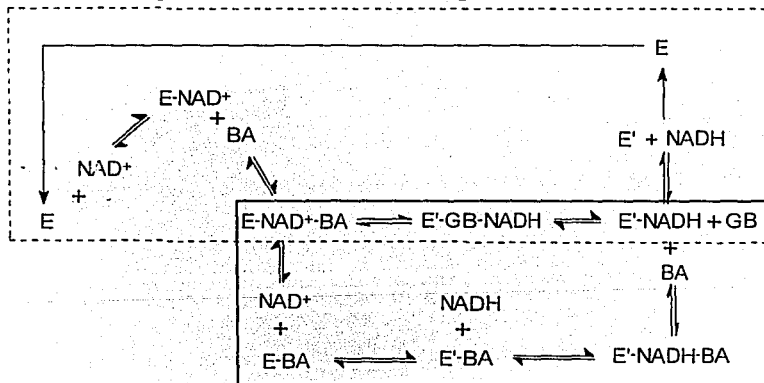
mecanismo de reacción. En conjunto los datos de velocidad inicial, inhibición por producto e inhibición "sin salida" sugieren que el mecanismo de la BADH de hojas de amaranto es Iso Bi Bi Ordenado, en el cual NAD^+ es el primer sustrato que se une a la enzima y NADH el último que se disocia de ella, tal y como se discutió en el artículo 2. En un mecanismo Iso se tiene una forma estable de la enzima que no une al NAD^+ y que requiere convertirse en la forma capaz de unir el nucleótido; el paso de conversión de una forma a otra de la enzima afecta la ecuación de velocidad en presencia de alguno de los productos. Este mecanismo, aunque ya había sido descrito teóricamente por Cleland (1963), no había sido encontrado en ninguna enzima, así que el nuestro fue el primer trabajo publicado sobre este mecanismo basado en estudios de inhibición por producto.

De acuerdo con estos datos se propone un mecanismo químico para explicar tanto los datos obtenidos en los estudios de inhibición por producto, sin salida y de modificación química de grupos sulfhidrilos (artículo 2). Este mecanismo requiere la presencia de dos grupos, uno protonado, posiblemente un grupo SH, el cual lleva a cabo la protonación del oxígeno carbonilo, y otro sin protonar, el cual lleva a cabo la desprotonación del agua lítica. En efecto, la dependencia de la actividad con respecto al pH mostró que se requieren de dos grupos, uno protonado y otro sin protonar, para la actividad de la BADH de hojas de amaranto (artículo 1). Por tanto, es posible que el estado de protonación de estos grupos después de un ciclo catalítico y liberación de los productos difiera del estado en que se encuentran antes de la adición de los sustratos, y que la conversión a la forma que une los sustratos, o el cambio conformacional asociado con ello, sea un paso lento de la reacción.

En los estudios de velocidad inicial a altas concentraciones de BA, se encontró que la BA es un inhibidor capaz de unirse al complejo E-NADH. Esto se determinó por los

patrones de inhibición frente al otro sustrato NAD^+ y por estudios de inhibición doble, usando NADH como el segundo inhibidor. Observamos que BA es un inhibidor acompetitivo con respecto a NAD^+ y por otro lado que NADH aumenta el efecto inhibitorio que BA tiene por si misma, lo cual indica que la inhibición por sustrato resulta por la combinación de BA con el complejo E-NADH y no por la unión de BA a la enzima libre o a los complejos centrales.

La gráfica de Dixon de los datos obtenidos en los experimentos de inhibición por sustrato muestra que la inhibición por BA es parcial, lo cual indica que NADH puede liberarse del complejo E-NADH-BA. Si esto es así, a altas concentraciones de BA podría establecerse la secuencia de reacciones que se muestra en el esquema 1.



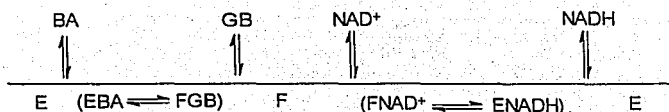
Mecanismo cinético propuesto en presencia de altas concentraciones de BA

Esquema 1

Es claro que en el caso de la BADH de amaranto a altas concentraciones de BA, el orden de adición de sustratos y liberación de productos corresponde a un mecanismo Ping Pong, sin embargo el mecanismo cinético difiere en que se sigue formando un complejo ternario central. Por ello el mecanismo

sigue siendo de sustitución simple y no de sustitución doble como correspondería a un verdadero mecanismo Ping Pong.

Como puede observarse a muy altas concentraciones de BA se establecería una ruta alterna con un orden de adición de sustratos y liberación de productos correspondiente a un mecanismo Ping Pong. Esto resulta interesante teniendo en cuenta que en microorganismos se ha reportado un mecanismo Ping Pong para esta enzima (Esquema 2) (Mori et al., 1980; Falkenberg y Strom, 1990).



Mecanismo Ping Pong propuesto para BADH de microorganismos

Esquema 2

Otro dato que refuerza la validez de la hipótesis de que se establece esta ruta alterna se obtuvo de los estudios de doble inhibición. En estos experimentos la inhibición sigue siendo mixta por tanto el mecanismo Iso sigue operando, pero los regráficos de intersección y pendiente mostraron que en estas condiciones el componente acompetitivo de la inhibición es lineal, mientras que el componente competitivo es parabólico como cabría esperar si la enzima sigue el mecanismo mostrado en el esquema 1.

Las líneas de la gráfica de Dixon cuando BA es el inhibidor variable son totalmente lineales, indicando que en presencia de NADH la inhibición por BA es total. Esto es

congruente con el mecanismo propuesto, que al adicionar NADH se contrarresta la liberación de éste del complejo E-NADH-BA que era la responsable de la parcialidad de la inhibición.

Cuando un inhibidor "sin salida" se une con E-NADH en un mecanismo ordenado el valor de β de la ecuación 3, no debe exceder de 1.0 (Northrop y Cleland, 1974) y en este caso, en donde NAD^+ estuvo presente a una concentración cercana a su K_m , β tuvo un valor de 0.98 ± 0.06 , lo cual de nuevo implica que el mecanismo sigue siendo ordenado y que BA se está uniendo al complejo E-NADH.

Los experimentos de inhibición por producto a concentraciones inhibitorias de BA muestran un patrón mixto, semejante al observado en los mismos experimentos realizados a bajas concentraciones de sustratos, lo cual confirma que aún a altas concentraciones de BA, el mecanismo Iso sigue operando. Es probable que se requieran concentraciones de BA muy superiores a las probadas en este estudio para que sólo la ruta alterna (en el recuadro de línea solida del esquema 1) esté operando.

VI.- CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Este trabajo ha permitido dar un paso más en la comprensión a nivel molecular de uno de los fenómenos fisiológicos ligado a condiciones ambientales adversas más relevantes para la sobrevivencia de una planta, como lo es la respuesta metabólica a la sequía.

En resumen, podemos enumerar los resultados más destacables de este trabajo:

- 1) La actividad de BADH responde positivamente al déficit de agua lo que a al déficit de agua, lo que subraya la importancia de esta enzima en la respuesta metabólica de la planta a esta condición de estrés.
- 2) La regulación de la actividad de la BADH por iones es congruente con el papel de esta enzima en la síntesis de un osmolito durante el déficit de agua.
- 3) La enzima posee un residuo cisteína esencial al igual que ha sido descrito para otras aldehído deshidrogenasas. Al parecer también son importantes para la actividad residuos de arginina e histidina, que no se han descrito previamente en este tipo de enzimas.
- 4) El mecanismo cinético implica un paso de isomerización de la enzima libre, relevancia fisiológica se desconoce por el momento.
- 5) La enzima se inhibe parcialmente por su sustrato aldehído, inhibición debida a la formación del complejo sin salida E-NADH-aldehído y cuya parcialidad probablemente se deba al establecimiento de una ruta alterna de reacción.
- 6) la demostración del mecanismo cinético de esta enzima, diferente al de las otras aldehído deshidrogenasas estudiadas, y que es el único mecanismo iso reportado hasta la fecha. Este hallazgo es de importancia para la enzimología en general.

Dado que para poder tener una visión integral de los mecanismos bioquímicos que operan durante el proceso de respuesta a la pérdida de agua la purificación y caracterización cinética de la enzima betaína aldehído

deshidrogenasa, involucrada en la síntesis de un osmolito, la glicina betaína constituye un avance importante en esta área.

Sin embargo aún quedan muchas preguntas sin contestar con respecto a esta enzima muchas de ellas surgidas de los resultados de este trabajo. Por ejemplo resulta imperativa la preparación de anticuerpos anti-BADH para determinar si el incremento en actividad de esta enzima en respuesta a la pérdida de agua, se debe a un aumento en la concentración de proteína BADH o a una activación de la enzima preexistente. Otro aspecto que también sería importante investigar es si existe alguna relación entre los niveles de ácido abscísico, como un probable indicador de pérdida de agua, y la actividad de la enzima. Adicionalmente aún queda mucho por hacer para lograr la caracterización completa del sitio activo de esta enzima.

Finalmente, desde un punto de vista de ciencia básica, resulta muy interesante profundizar en el estudio del mecanismo Iso.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, N., Wyn Jones, R.G. y W. Jeschke (1987). Effect of Exogenous Glycinebetaine on Na⁺ Transport in Barley Roots. J. Exp. Botany 191:913-921.
- Algar, E.M. y R.S. Holmes (1985). Mouse Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase (EC 1.2.1.3) Isozymes: Purification and Molecular Properties. Int. J. Biochem. 17:51-60.
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T. and T. Akazawa (1987). Purification of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from Spinach Leaves and Preparation of its Antibody. J. Biochem. 101:1485-1488.
- Arakawa, K., Katayama, M., y T. Takabe (1990). Levels of Betaine and Betaine Aldehyde Dehydrogenase Activity in the Green Leaves, and Etiolated Leaves and Roots of Barley. Plant Cell Physiol. 31:797-803.
- Arakawa, K., Mizuno, K., Kishitani, S. y T. Takabe (1992). Immunological Studies of Betaine Aldehyde Dehydrogenase in Barley. Plant Cell Physiol. 33:833-840.
- Asker, H. y D.D. Davies (1985). Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase from Higher Plants. Phytochem. 24:689-693.
- Bedino, S., Testore, G. y F. Obert (1990). Initial Characterization of Aldehyde Dehydrogenase from Rat Testis Cytosol. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 371:95-101.
- Borowitzka, L.J. y A.D. Brown (1974). The Salt Relations of Marine and Halophylic Species of the Unicellular Green Alga *Dunaliella*. The Role of Glycerol as a Compatible Solute. Arch. Microbiol. 96:137-152.
- Boyd, L.A., Adam, L., Pelcher, L.E., McHugen, A., Hirji, R. y G. Selvaraj (1991). Characterization of an *Escherichia coli* Gene Encoding Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH): Structural Similarity to Mammalian ALDHs and a Plant BADH. Gene 103:45-52.
- Bray, E. (1993). Molecular Responses to Water deficit. Plant Physiol. 103:1035-1040.
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C.F. y A.D. Hanson (1989). Evidence for a Ferredoxin-dependent Choline

- Monooxygenase from Spinach Chloroplast Stroma. *Plant Physiol.* 90:322-329.
- Cleland W.W. (1963) The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions With Two or More Substrates or Products. I.- Nomenclature and Rate Equations. *Biochim. Biophys. Acta.* 67:104-137.
 - Coughlan, S.J. y U. Heber (1982). The Role of Glycinebetaine in the Protection of Thylakoids Against Freezing Stress. *Planta* 154:6-17.
 - Creaser, E.H., Porter, R.L. y J.A. Pateman (1987). Purification and Properties of Aldehyde Dehydrogenase from *Aspergillus nidulans*. *Int. J. Biochem.* 19:1009-1012.
 - Dickinson, F. M. (1989). Aldehyde Dehydrogenase: Kinetics and Mechanism. *Biochem. Soc. Trans.* 17:299-300.
 - Downtown, W.J.S. (1973) *Amaranthus edulis*: A High Lysine Grain Amaranth. *World Crops* 25:20.
 - Falkenberg, P. y A.R. Strom (1990) Purification and Characterization of Osmoregulatory Betaine Aldehyde Dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034:253-259.
 - Feldman, R.I. y H. Weiner (1972). Horse Liver Aldehyde Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 247:267-272.
 - Gamboa, A., Valenzuela, E. M. y E. Murillo (1991). Biochemical Changes Due to Water Loss in Leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *J. Plant Physiol.* 137:586-590.
 - Hanson, A.D. y W.A. Hitz (1982). Metabolic Responses of Mesophytes to Plant Water Deficits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33:163-203.
 - Hanson, A.D., May, A.M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G.C. y D. Rhodes (1985). Betaine Synthesis in Chenopods: Localization in Chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3678-3682.
 - Hart, G.J. y F.M. Dickinson (1985). Kinetic Properties of Highly Purified Preparations of Sheep Liver Cytoplasmic Aldehyde Dehydrogenase. *Biochem. J.* 203:617-627.
 - Hempel, J., Nicholas, H., y R. Lindahl (1993). Aldehyde Dehydrogenases: Widespread Structural and Functional Diversity Within a Shared Framework. *Protein Science* 2:1890-1900.

- Imohff, J.F. y F. Rodriguez-Valera (1984). Betaine is the Main Compatible Solute of Halophylic Eubacteria. *J. Bacteriol.* 160:478-479.
- Jolivet, Y., Larher, F. y J. Hamelin (1982). Osmoregulation in Halophytic Higher Plants: The Protective Effect of Glycine Betaine Against the Heat Destabilization of Membranes. *Plant Sci. Lett.* 25:193-201.
- Kitson, T.M. (1985). High Concentrations of Aldehydes Slow the Reaction of Cytoplasmic Aldehyde Dehydrogenase with Thiol-Group Modifiers. *Biochem. J.* 228:765-767
- Kitson, T.M., Hill, J.P. y G.G. Midwinter (1991). Identification of a Catalytically Essential Residue in Sheep Liver Cytoplasmic Aldehyde Dehydrogenase. *Biochem. J.* 275:207-210.
- Kramer, P. J. (1969). *Plant Soil Water Relationship A Modern Synthesis*. McGraw Hill Book Company N. Y., Cap. 1, pp 59-60.
- Lee, S.G. y Y.D. Cho (1992). Purification and Characterization of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from Soybean, *Glycine max.*, Axes. *Kor. Biochem. J* 25:664-669.
- Lerma, C., Hanson, A.D. y D. Rhodes (1988). Oxygen-18 and Deuterium Labeling Studies of Choline Oxidation by Spinach and Sugar Beet. *Plant Physiol.* 88:695-702.
- Lindahl, R. y S. Evces (1984). Rat Liver Aldehyde Dehydrogenase (EC 1.2.1.3): 1. Isolation and Characterization of 4 High Michaelis Constant Normal Liver Isozymes. *J. Biol. Chem.* 259:11986-11990.
- Manetas, Y., Petropoulou, Y. y G. Karabourniotis (1986). Compatible Solutes and Their Effects on Phosphoenolpyruvate Carboxylase of C₄-Halophytes. *Plant Cell Environ.* 9:145-151.
- McCue, K.F. y A. D. Hanson (1992). Salt-inducible Betaine Aldehyde Dehydrogenase from Sugar Beet: cDNA Cloning and Expression. *Plant Mol. Biol.* 18:1-11.
- Meury, J. (1988). Glycinebetaine Reverse the Effects of Osmotic Stress on DNA Replication and Cellular Division in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 149:232-239.

- Morgan, J.M. (1984). Osmoregulation and Water Stress in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:299-319.
- Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y. y H. Yamada (1980). Characterization of Betaine Aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* 44:3015-3016.
- Mori, N., Yoshida, N. y Y. Kitamoto (1992). Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Fermt. Bioeng.* 73:352-356.
- Motion, R.L., Blackwell, L.F., y P.D. Buckley (1984). Activating Effect of p-(Chloromercuri)benzoate on the Cytoplasmic Aldehyde Dehydrogenase from Sheep Liver. *Biochem.* 23:6851-6857.
- Nagasawa T., Kabawata, Y., Tani, Y. y H. Yamada (1976). Purification and Characterization of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agr. Biol. Chem.* 40:1743-1749.
- Nilson, G.E. y O. Tottmar (1985). Biogenic Aldehydes in Brain: Characteristics of a Reaction Between Rat Brain Tissue and Indole-3-acetaldehyde. *J. Neurochem.* 45:744-751.
- Northrop, D.B. y W.W. Cleland (1974). The Kinetics of Pig Heart Triphosphopyridine Nucleotide- Isocitrate Dehydrogenase-. *J. Biol. Chem.* 249:2928-2931.
- Pan, S.M. (1988). Betaine Aldehyde Dehydrogenase in Spinach. *Bot. Bull. Academia Sinica.* 29:255-263.
- Reed, R.H., Borowitzka, L.J., Mackay, M.A., Chudek, J.A., Foster, R., War, S.R.C., Moore, D.J. y W.D.P. Stewart (1984). Organic Solute Accumulation in Osmotically Stressed Cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39:51-56.
- Renosto, F., Martin, R.L. y I.H. Segel (1987). ATP Sulfurilase from *Phenicillium chrysogenum*. *J. Biol. Chem.* 262:16279-16288.
- Rhodes, D. y A.D. Hanson (1993). Quaternary Ammonium and Tertiary Sulfonium Compounds in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:357-384.
- Robinson, S.P. y G.P. Jones (1986). Accumulation of Glycinebetaine in Chloroplasts Provides Osmotic Adjustment During Salt Stress. *Aust J. Plant Physiol.* 13:659-668.

- Rudolph, A.S., Crowe, J.H. y L.M. Crowe (1986). Effects of Three Stabilizing Agents-Proline, Betaine, and Trehalose- on Membrane Phospholipids. Arch. Biochem. Biophys. 245:134-143.
- Ryzlak, M.T. y R. Pietruzko (1988). Purification and Characterization of Aldehyde Dehydrogenase from Human Brain. Arch. Biochem. Biophys. 255:409-418.
- Schröppel-Meier, G. y M.M. Kaiser (1988). Ion Homeostasis in Chloroplasts Under Salinity and Mineral Deficiency. Plant Physiol. 87:822-827.
- Segura-Nieto, M., Vazquez-Sanchez, N., Rubio-Velazques, H., Olguín-Martínez, L., Rodríguez-Nester, C. y L. Herrera-Estrella (1992). Characterization of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Seed Proteins. J. Agric. Food Chem. 40:1553-1558.
- Simpson, V.J., Baker, R. y R.A. Dietrich (1985). Inducible Aldehyde Dehydrogenase from Rat Liver Cytosol. Tox. Appl. Pharm. 79:193-203.
- Teutonico, R.A. y D. Knorr (1985). Amaranth Composition, Properties, and Applications of a Rediscovered Food Crop. Food Technol. 39:49-61.
- Tu, G-C y H. Weiner (1988). Identification of the Cysteine Residue in the Active Site of Horse Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. J. Biol. Chem. 263:1212-1217.
- Turner, W.C. (1986). Adaptation to Water Deficits: Changing Perspectives. Aust. J. Plant Physiol. 13:175-190.
- Valdes-Rodríguez, S., Segura-Nieto, M., Chagolla-Lopez, A., Verver y Vargas-Cortina, A., Martínez-Gallardo, N. y A. Blanco-Labra (1993). Purification, Characterization, and Complete Amino Acid Sequence of a Trypsin Inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) Seeds. Plant Physiol. 103:1407-1412.
- Weigel, P., Weretilnyk E.A. y A.D. Hanson (1986). Betaine Aldehyde Oxidation by Spinach Chloroplasts. Plant Physiol. 82:753-759.
- Weretilnyk, E.A. y A.D. Hanson (1989). Betaine Aldehyde Dehydrogenase from Spinach Leaves: Purification, in vitro

Translation of the mRNA, and Regulation by Salinity. Arch. Biochem. Biophys. 271:56-63.

- Weretilnyk, E.A. y A.D. Hanson (1990). Molecular Cloning of a Plant Betaine Aldehyde Dehydrogenase, an Enzyme Implicated in Adaptation to Salinity and Drought. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2745-2749.

- Wyn Jones, R.G., Storey, R., Leigh, R.A., Ahmad, N. y A. Pollard (1977). A Hypothesis on Cytoplasmic Osmoregulation. En: Regulation of Cell Membrane Activities in Higher Plants (Eds. Marré, O. Ciferri), pp 121-136. Elsevier/North Holland, Amsterdam

- Wyn Jones, R.G. y R. Storey (1981). Betaines. En: Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants (Eds. Paleg L.G. and D. Aspinall), pp 171-204. Academic Press, Sydney.

- Wyn Jones, R.G. y J. Gorham (1983). Osmoregulation. En: Encyclopedia of Plant Physiology NS (Eds. Lange, O.L., P.S. Nobel, C.B. Osmond and H. Ziegler). Vol 12C, pp 35-58. Springer-Verlag, Berlin.

- Wyn Jones, R.G. (1984). Phytochemical Aspects of Osmotic Adaptation. En: Recent Advances in Phytochemistry (Ed. F.A. Lowus) pp 345-365. Academic Press, London.

- Yancey, P.H., Clark, M. E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. y G.M. Somero (1982). Living With Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems. Science 217:1214-1222.

Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase Extracted from Detached Leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. Subjected to Water Deficit

ELISA M. VALENZUELA-SOTO and ROSARIO A. MUÑOZ-CLARES

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 04510

Received February 23, 1993 · Accepted July 24, 1993

Summary

The activity of the enzyme betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8) from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. rises from undetectable levels to 10^{-3} units/mg protein after 4 h of treatment with 17% (w/v) polyethyleneglycol to produce a water deficit. This enzyme was purified to apparent homogeneity in only three consecutive steps: fractional precipitation with ammonium sulfate, ion exchange, and affinity chromatography on 5'-AMP Sepharose. A specific activity of 2.6 mol/min kg (protein) was obtained. The enzyme has a native molecular mass of 125 kDa, estimated by gel filtration chromatography, and a subunit molecular mass of 63 kDa, determined by SDS-PAGE. The reaction is highly specific for betaine aldehyde, which is an inhibitor at high concentrations, but can use NAD⁺ or NADP⁺ as nucleotide. The estimated *K_m* values at pH 8.0 and 30 °C for NAD⁺, NADP⁺, and betaine aldehyde were 80 μM, 2.5 mM, and 69 μM respectively. The reaction could not be reversed even at very high glycine betaine concentrations. The optimum pH and temperature were 8.0 and 50 °C, respectively. The pH dependence of the velocity indicated the existence of two ionizable groups of macroscopic p*K* values of 6.78 ± 0.02 and 9.38 ± 0.01 involved in catalysis and/or binding of the substrates. Chemical modification studies suggested the presence of essential cysteine(s), histidine(s), and arginine(s) residues. The enzyme was activated by relatively low concentrations of K⁺, sucrose, and proline, while it was inhibited by NH₄⁺, Na⁺, and high concentrations of glycine betaine. Mg²⁺ up to 150 mM and Ca²⁺ up to 50 mM did not have any effect on the activity.

Key words: *Amaranthus hypochondriacus* L., betaine aldehyde dehydrogenase, purification, water deficit, compatible solutes, monovalent cations.

Abbreviations: BA = betaine aldehyde; BADH = betaine aldehyde dehydrogenase; DEPC = diethyl pyrocarbonate; DTNB = 5-5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid; EDTA = ethylenediaminetetra-acetic acid; Hepes = N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; MES = 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; PAGE = polyacrylamide gel electrophoresis; PEG = polyethyleneglycol; RWC = relative water content; SDS = sodium dodecyl sulfate; Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethane.

Introduction

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8 betaine aldehyde:NAD⁺ oxidoreductase) catalyzes the final

step in the synthesis of glycine betaine from choline by bacteria (Nagasawa et al., 1976; Falkenberg and Strom, 1990) and plants (Pan et al., 1981; Wercitilnyk and Hanson, 1989; Arakawa et al., 1990). This enzyme has been purified to ho-

mogeneity from spinach (Arakawa et al., 1987; Weretilnyk and Hanson, 1989), *Pseudomonas* (Nagasawa et al., 1976), and *Escherichia coli* (Falkenberg and Strom, 1990).

Under salt stress or water deficit, higher plants accumulate large amounts of organic solutes inside their cells (Hanson and Hitz, 1982; Yancey et al., 1982; Wyn Jones and Gorham, 1983; Ibarra-Caballero et al., 1988). Several angiosperm families including Chenopodiaceae and Gramineae accumulate glycine betaine in their leaves (Hanson and Scott, 1980; Wyn Jones and Storey, 1981; Pan et al., 1981; Hanson and Hitz, 1982; Arakawa et al., 1990). Accordingly, increases in the leaf levels of BADH have been found in the response to saline stress in spinach (Weretilnyk and Hanson, 1989) and barley (Arakawa et al., 1990). However, at the time we carried out this work, the effect of water stress on BADH activity in plants had not been found. In fact, a report by Pan et al. (1981) indicated that BADH activity does not increase after water-stressing spinach leaves. Since amaranth leaves subjected to water deficit accumulate glycine betaine (Gamboa et al., 1991), we were interested in investigating whether in Amaranthaceae BADH activity increases when plants are subjected to water stress, and in characterizing this activity in this family of plants.

Here we report that the activity levels of amaranth leaf BADH greatly increased upon subjecting the plants to water deficit. In addition, we have purified and determined some properties of this enzyme as a first step in our studies on the metabolism of plants under water deficit.

Materials and Methods

Plant Material

Amaranthus hypochondriacus L. plants were grown in a naturally illuminated greenhouse at temperature between 18–30°C. Plants 6 to 8 weeks old were used for the purification. Detached intact leaves were water-stressed under daylight by a 4-h immersion of the petiole in a 17.2% (w/v) PEG 6000 solution, equivalent to a water potential value of -1.0 MPa (Money, 1989). Control leaves were treated as above, but using water instead of PEG.

Enzyme extraction and purification

Water-stressed leaves were homogenized in a Waring blender in a 1:2 (w/v) ratio in 100 mM sodium pyrophosphate, pH 8.5, 1 mM EDTA, 0.6 M sucrose, and 14 mM β -mercaptoethanol. The brei was squeezed through six layers of miracloth and centrifuged at 110,000 \times g for 30 min. Solid ammonium sulfate was added to the supernatant to give 35% saturation and centrifuged at 11,000 \times g for 15 min. The supernatant was brought to 75% saturation with ammonium sulfate; the precipitated protein was isolated by centrifugation as above; resuspended in 10 mM Hepes-KOH buffer, pH 7.9, containing 10% (v/v) glycerol, and 14 mM β -mercaptoethanol (buffer B); and desalted by gel filtration through a Sephadex G-25 column that was equilibrated and eluted with the same resuspension buffer. This solution was then applied to a Q-Sepharose Fast Flow (1.8 \times 6.5 cm) column equilibrated with the same buffer. After washing the column, the enzyme was eluted by a linear gradient (50–300 mM) of potassium chloride in buffer B. Fractions containing activity were pooled and desalted on a Sephadex G-25 column equilibrated and eluted with 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.6, containing 14 mM β -mercaptoethanol and 10% (v/v) gly-

cerol (buffer C). The desalted preparation was applied to 5'-AMP-Sepharose column (1 mL bed volume) equilibrated with buffer C at room temperature. The enzyme was eluted with 0.125 mM AMP in buffer C. The purified samples thus obtained were stored in buffer C made 25% (v/v) with glycerol and kept at -70°C until use. All the procedure, except the affinity chromatography step, was carried out at 4°C.

Enzyme assay

BADH was assayed spectrophotometrically measuring NAD⁺ reduction by the increase in extinction at 340 nm in a Beckman DU-65 spectrophotometer. Temperature was maintained at 30°C using a water bath with the capacity to heat and cool the thermostats of the cell compartment. The standard assay system contained, in a final volume of 0.4 mL, 100 mM Hepes-KOH buffer, pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.5 mM BA, and 1.0 mM NAD⁺. The reaction was started by the addition of enzyme (0.5 μ g of pure enzyme). Rates in the absence of BA were negligible. Each determination was performed at least in duplicate. The assay was always linear. Enzyme activity is expressed on a protein basis (units: μ mol/min). The pH of the inorganic salts stock solutions was previously adjusted to the pH of the assay medium, when necessary, using appropriate amounts of sodium pyrophosphate.

Protein determination

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Electrophoresis

SDS-PAGE separations were made according to Laemmli (1970). Nondenaturing (native) PAGE was carried out in minislab gels (Hoefler). The resolving gel contained 8% (w/v) acrylamide and 0.3% (w/v) bisacrylamide. Protein was detected by silver staining according to the method of Wray et al. (1981). BADH activity in native-PAGE was detected by incubating the gel at room temperature with 100 mM Hepes-KOH buffer, pH 8.0, containing 0.5 mM betaine aldehyde, 1.0 mM NAD⁺, 20 mg/L phenazine methosulfate, and 300 mg/L nitroblue tetrazolium, in 25 mL of mixture, according to Arakawa et al. (1990).

Molecular weight measurements

The molecular weight of the native enzyme was estimated by high performance liquid chromatography (HPLC) using a TSKG 4000 SW-LKB column and the following proteins as Mr standards: β -galactosidase (*E. coli*) (465,000), ferritin (440,000), alcohol dehydrogenase (150,000), Fab fragment from IgG (50,000), and myoglobin (17,000). The molecular weight of the subunit of the enzyme was measured by SDS-PAGE with the following standards proteins: α -lactalbumin (14,200), trypsinogen (24,000), carbonic anhydrase (29,000), glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (36,000), albumin, egg (45,000), and bovine albumin (66,000), by the method described above.

pH-stability determination

To test the pH-stability of the enzyme, purified BADH (0.5 μ g in 0.4 mL) was kept at 30°C for the time of the assay (10 min) in 0.1 M Mes (pH 5.5–6.5), phosphate (pH 6.5–8.0), and pyrophosphate

(8.5–9.5) buffers. The remaining activity was assayed immediately after these treatments using the standard assay described above.

Data analysis

Apparent K_m values were obtained by fitting the initial velocity data obtained by varying the concentration of one substrate while keeping constant the concentration of the other to the Michaelis-Menten equation (eq 1) (Segel, 1975) by nonlinear regression, using a computer program written by Leatherbarrow (Leatherbarrow, 1987).

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

where v is the experimentally determined initial velocity, V is the maximum velocity, $[S]$ is the variable substrate concentration, and K_m is the apparent Michaelis constant for this substrate.

The same program was used to analyze the inhibition by BA, and the pH dependence of the velocity profiles. Data conforming to substrate inhibition were fitted to eq 2:

$$v = \frac{V[S]}{K_m + [S] + [S]^2/K_i} \quad (2)$$

where K_i is the apparent inhibition constant of the substrate, and all other terms are as defined above.

Since activity was lost at acid and basic pH values, the pH/activity profile was drawn by fitting the appropriate data to the exponential form of eq 3 (Cleland, 1979):

$$v = \frac{c}{1 + \frac{[H^+]}{K_a} + \frac{K_b}{[H^+]}} \quad (3)$$

where K_a and K_b are the macroscopic dissociation constants of the groups that ionize, and c is the pH independent value of the parameter v , that in this case is the experimentally determined initial velocity.

Chemicals and Biochemicals

Betaine aldehyde chloride, NAD⁺, NADH, NADP⁺, nitroblue tetrazolium, AMP, prestained Mr SDS-PAGE standards, glycine betaine, DTNB, DEPC, Hepes and Mes were obtained from Sigma. HPLC Mr standards were from Boehringer Mannheim. Sephadex G-25, Q-Sepharose Fast Flow and 5'-AMP-Sepharose were from Pharmacia. Butanedione, and phenazine methosulfate were obtained from Aldrich. All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Results and Discussion

Changes in BADH activity induced by water deficit

We could not detect BADH activity in crude extracts of nonstressed amaranth leaves, even after concentrating the crude extract by precipitation with ammonium sulfate. However, when the leaves were subjected to water deficit, as described under Methods, this activity, expressed on a protein basis, increased with time as shown in Fig. 1. Control detached leaves, treated with water instead of PEG, did not show any increase in BADH activity (not shown). The observed increases in BADH activity paralleled the increases in the levels of glycine betaine in amaranth leaves subjected to

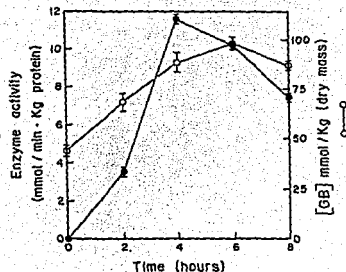


Fig. 1. Changes on amaranth-leaf BADH activity (●) and glycine betaine content (○) induced by water deficit in amaranth leaves. The glycine betaine data are taken from Gamboa et al. (1991) with permission.

the same conditions (Gamboa et al., 1991). Both responses showed their maxima after 4 h of treatment, which correspond to 60% RWC (Gamboa et al., 1991). After that point, enzyme activity and content of glycine betaine decreased, suggesting that the response of the plant to more severe water deficit is mediated by a different mechanism. In fact, from this RWC onwards the levels of proline began to rise (Gamboa et al., 1991). Therefore, it appears that in amaranth leaves the synthesis of glycine betaine is an early response to relatively mild water loss.

At present, we do not know whether the changes in BADH activity are the result of the activation of preexistent enzyme or *de novo* synthesis of protein, although the latter possibility seems more plausible given the time required to achieve the activity peak, and by analogy with the known effect of salt stress on this enzymatic activity in other plants (Weretilnyk and Hanson, 1989; Arakawa et al., 1990). In fact, while this manuscript was in preparation we became aware of a very recent paper by Arakawa et al. (1992) that showed that increases in BADH protein take place in barley leaves after three days of treatment of the whole plant with PEG. This finding is in full agreement with the increases in BADH activity in response to water stress we report here.

Under our experimental conditions, the response of BADH activity can be observed as soon as 4 h after the beginning of the treatment, and the whole plant is not necessary to obtain this response. This last result contrasts with the observation by others that the whole plant has to be water-stressed in order to observe changes in the proline content of the leaf (Ibarra-Caballero et al., 1988; Gamboa et al., 1991). Therefore, it seems that the mechanism that mediates the accumulation of glycine betaine and proline in response to water stress is not the same.

Although there is an earlier report indicating that BADH activity did not increase after water-stressing spinach leaves (Pan et al., 1981), we did find a significant increase in BADH activity in spinach leaves when subjected to the same treatment as the one we used for water-stressing amaranth leaves

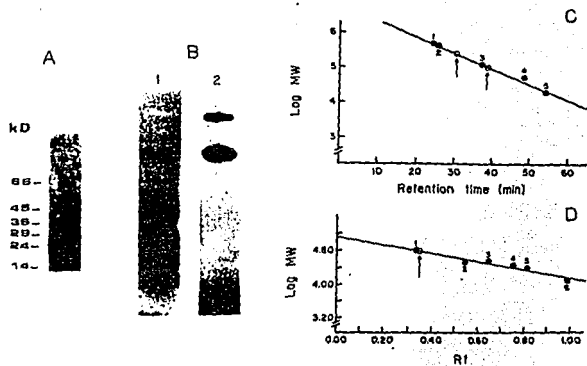


Fig. 2: PAGE of amaranth-leaf BADH. A: Purified enzyme, SDS-PAGE, silver-staining. B: Native PAGE, lane 1, purified enzyme, activity-staining; lane 2, purified enzyme, silver-staining. C: Estimation of native molecular weight by HPLC-TSK gel chromatography. 1, β -galactosidase; 2, ferritin; 3, alcohol dehydrogenase; 4, fab fragment from IgG; 5, myoglobin. D: Estimation of molecular weight of subunit by SDS-PAGE. (●) protein standards, (○) purified BADH. 1, albumin bovine; 2, albumin egg; 3, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; 4, carbonic anhydrase; 5, trypsinogen; 6, α -lactalbumin.

(not shown). The reason for the discrepancies between our findings and those in the literature is not clear at present.

Enzyme Purification

For the purification we used leaves that had been subjected to water deficit prior to extraction, in order to increase the activity of BADH. Even after the water-stress treatment we could not detect BADH activity in crude extract. Only after concentrating the crude extract by precipitation with ammonium sulfate could the activity be measured, and because of that we refer to this step for the calculation of yield and times of purification. Table 1 summarizes a typical purification procedure from 70 g of amaranth leaves. The enzyme was purified after only two chromatographic steps. Since ammonium ions are inhibitors of the enzyme (see below), the activity corresponding to the ammonium sulfate precipitation step is the one measured after desalting by Sephadex-

G-25. The Q Sepharose Fast Flow chromatography consistently gave a very good purification without appreciable activity loss. The resulting enzyme preparation was judged to be pure by silver-staining of SDS-PAGE, which showed a single band (Fig. 2 A). Native gel electrophoresis also gave one activity-staining band although it gave two silver-staining bands, (Fig. 2 B) corresponding to the tetrameric and dimeric forms (see below). The purified BADH can be stored as described under Materials and Methods at -70°C for several months without appreciable loss of activity. Omission of glycerol resulted in a total loss of activity upon freezing.

Our purification scheme is much simpler than the one used by Arakawa et al. (1987) and by Weretilnyk and Hanson (1989) for the purification of spinach BADH, and similar to the one reported by Falkenberg and Strom (1990) in the purification of BADH from *E. coli*, although we eliminated the gel filtration step used by these latter authors.

Molecular weight

Two protein peaks were eluted from the HPLC-gel filtration chromatography, one inactive with an apparent Mr of 250 kDa, and the other fully active with an apparent Mr of 125 kDa (Fig. 2 C). When subjected to SDS-PAGE and silver staining, both peaks gave only the polypeptide corresponding to BADH with an apparent Mr of 63 kDa (Fig. 2 D), indicating that active BADH exists as a dimer and that the tetrameric form, likely formed during purification or storage, is inactive. Therefore amaranth BADH seems to be very similar in this respect to the enzyme from other plants (Weretilnyk and Hanson, 1989; Arakawa et al., 1987) and *Pseudomonas* (Nagasawa et al., 1976), but different than the enzyme from *E. coli* and *Cylindrocarpum didymum*, which are tetrameric in their active form (Falkenberg and Strom, 1990; Mori et al., 1980).

Table 1: Purification of betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves subjected to water deficit.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity ^a (units)	Specific activity (units/mg protein)	Purification (fold)	Yield ^b (%)
Crude extract ^c	216.00	N	N		
Desalted ammonium sulfate				1	100
Q-Sepharose eluate	84.50	0.638	0.002		
5'-AMP-Sepharose eluate	5.93	0.385	0.045	22	92
	0.06	0.159	2.650	1260	27

^a Assays were carried out as described in the text. One unit of enzymatic activity is defined as the amount of enzyme required to catalyse the reaction of 1 $\mu\text{mol NAD}^{+}$ /min under the standard assay conditions described under Materials and Methods.

^b Calculated from the ammonium sulfate precipitation step.

^c Prepared from 70 g of leaf material.

N = negligible

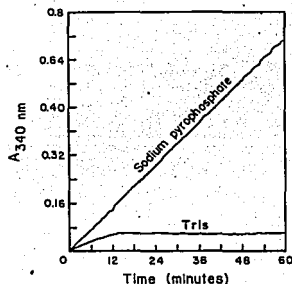


Fig. 3: Progress curves of amaranth-leaf BADH in 0.1 M sodium pyrophosphate buffer, pH 8.0, and 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0, at substrate concentrations 1.0 mM NAD^+ and 0.5 mM BA.

Effects of buffer composition, pH, and temperature on BADH activity

Significant buffer effects on BADH activity could be demonstrated with Tris-HCl buffer, as has been reported for other aldehyde dehydrogenases (Rivett and Tipton, 1981; Satya and Nair, 1989). The progress curves of the reaction in 0.1 M Tris-HCl buffer and 0.1 M pyrophosphate buffer under identical conditions are compared in Fig. 3. When the assay was carried out in Tris-HCl buffer, not only did the rate decrease rapidly, making it difficult to measure the initial rate, but it also was much slower than in pyrophosphate buffer. Assays in Hepes 0.1 M gave exactly the same results as in pyrophosphate buffer (data not shown); this implies that the observed effects were due to inhibition by Tris and not to activation by pyrophosphate. It has been reported that Tris inhibits other aldehyde dehydrogenases, probably due to formation of a complex between Tris and the aldehyde (Ogilvie and Whitaker, 1976). In view of these results, all the enzymatic assays reported here were performed in pyrophosphate or Hepes buffers.

The enzyme was stable between pH 5.5 and 9.5 (not shown). The pH/activity profile of BADH showed an optimum at pH 8.0 and two essential ionizable groups of pK 6.78 ± 0.02 and 9.38 ± 0.01 (Fig. 4 A), one of which must be protonated and the other one deprotonated for catalysis and/or binding of the substrate. The optimum pH found is in agreement with the data from other BADHs, in which this value varies between 7.5–9.0 (Nagasawa et al., 1976; Pan et al., 1981; Weretilnyk and Hanson, 1989; Falkenberg and Strom, 1990).

The temperature optimum for the purified enzyme was 50 °C (Fig. 4 B). Above 55 °C the activity decreased markedly. The activation energy of the reaction between 25 and 50 °C was estimated at 61.8 KJ/mol (Fig. 4 C).

Essential amino acid residues of amaranth BADH

Recently the amino acid sequence of spinach BADH has been published (Weretilnyk and Hanson, 1990). When com-

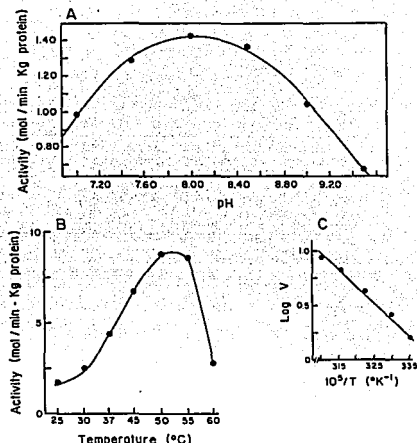


Fig. 4: A: Effect of pH on activity of purified amaranth-leaf BADH. BADH activity was assayed at the indicated pH values in 100 mM phosphate (pH 7.0–8.0), and pyrophosphate (8.5–9.5) buffers, under otherwise identical conditions to the standard assay described under Materials and Methods. The points are the experimental data. The line is theoretical from the best fit to eq. 3 described under Materials and Methods. B: Effect of temperature on the activity of purified amaranth leaf betaine aldehyde dehydrogenase. BADH activity was assayed under the standard conditions at indicated temperatures. The points are the experimental data, the line is hand drawn. C: determination of the energy of activation from the data of figure C.

pared with other aldehyde dehydrogenases, there is one residue of cysteine highly conserved. Therefore, we considered it of interest to determine whether this amino acid is involved in catalysis in the amaranth enzyme. With this aim, we treated the purified enzyme (about 0.5 μg) with DTNB, a well known specific reagent for sulphydryl groups (Ellman, 1959), after eliminating the β -mercaptoethanol present in the enzyme preparation by dialysis under N_2 atmosphere. BADH was rapidly inactivated after 1 min of preincubation with 1.0 mM DTNB at 30 °C, suggesting the involvement of cysteine residues in the activity or stability of the enzyme.

We also investigated the role of histidyl and arginyl residues in the catalytic process by using DEPC, a reagent that modifies histidine (Melchior and Fahrney, 1970) and butanedione, a specific reagent for arginine (Riordan, 1973). Incubation of the enzyme with 0.5 mM DEPC resulted in total inactivation after 15 min. The enzyme was also inactivated after 30 min preincubation at 30 °C with 15 mM 2,3-butanedione in the presence of 30 mM borate, which is known to facilitate inactivation by this reagent by stabilizing the inactive form of enzyme modified with butanedione (Rao et al., 1987). Borate was also included in the assay mixture in order to prevent the reversibility of the inactivation. Therefore it

appears that histidine and arginine residues may be also essential for this enzymatic activity.

Kinetic properties

Amaranth BADH was found to be highly specific for BA as substrate and could not use any of the following aldehydes: acetaldehyde, benzaldehyde, butyraldehyde, formaldehyde, glycerinaldehyde, glyceraldehyde-3-phosphate, glutaraldehyde, propionaldehyde, or succinic semialdehyde. All of these were tested at 0.5 mM in standard assay mixtures containing 1 mM NAD^+ . At this NAD^+ concentration the apparent K_m value for betaine aldehyde was $69 \pm 0.6 \mu\text{M}$. Regarding the nucleotide, the enzyme can use NAD^+ and NADP^+ as cofactors, although NAD^+ was preferred. Thus, the apparent K_m values for NAD^+ and NADP^+ at 0.5 M BA were $80 \pm 0.5 \mu\text{M}$ and $2.5 \pm 0.2 \text{ mM}$ respectively. These values are in close agreement with those reported for other plant BADHs (Weretilnyk and Hanson, 1989; Arakawa et al., 1990).

The oxidation of BA by BADH was found to be irreversible, as has been reported for the enzyme from *E. coli* (Falkenberg and Strom, 1990), *P. aeruginosa* (Nagasawa et al., 1976), spinach (Pan et al., 1981; Weretilnyk and Hanson, 1989), and for other aldehyde dehydrogenases (Rivett and Tipton, 1981; Satya and Nair, 1989). No oxidation of NADH could be observed with glycine betaine as substrate at concentrations up to 10 mM. Therefore, according to the

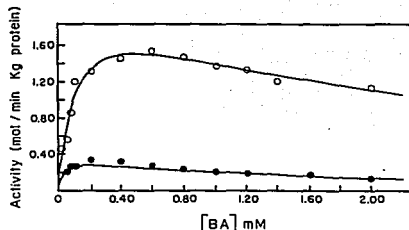


Fig. 5: Effect of betaine aldehyde concentration on initial velocity of purified amaranth leaf BADH. Assays were carried out at 30°C in 0.1 M sodium pyrophosphate, pH 8.0, at 0.5 (○) and 0.025 mM (●) NAD^+ and several BA concentrations. The points are the experimental data, the lines are theoretical from the best fit to eq 2 described under Materials and Methods.

classification of Jakoby (1963), amaranth-leaf BADH appears to belong to Class I aldehyde dehydrogenases.

Amaranth BADH follows Michaelian kinetics but is subject to substrate inhibition by BA, which is dependent on the concentration of the other substrate, NAD^+ (Fig. 5). At a subsaturating NAD^+ concentration (0.025 mM) the apparent K_i was $1.35 \pm 0.16 \text{ mM}$, while at saturating NAD^+

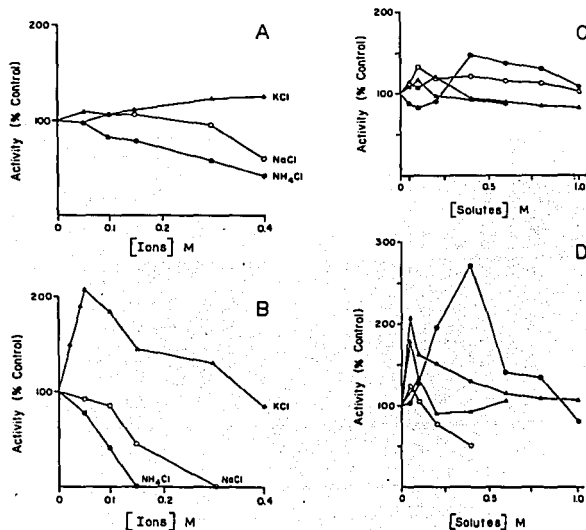


Fig. 6: Effect of univalent cations and organic solutes on purified amaranth-leaf BADH. Assays were performed at 30°C in 0.1 M sodium pyrophosphate, pH 8.0, at 0.5 mM BA, 1.0 mM NAD^+ (A and C), or 0.025 mM BA, 0.025 mM NAD^+ (B and D) in the presence of indicated concentrations of KCl, NaCl, and NH_4Cl , or glycine betaine (○), proline (●), sucrose (△), and mannitol (▲).

(0.5 mM) the apparent K_i was 2.11 ± 0.06 mM. Again, this property of being inhibited by the substrate aldehyde is common to several aldehyde dehydrogenases (Rivett and Tipton, 1981; Satya and Nair, 1989; Falkenberg and Strom, 1990). However it is doubtful that such inhibition has any physiological significance, since it is very unlikely that the intrachloroplast levels of BA come close to those at which inhibition takes place.

Effect of ions and compatible solutes on BADH activity

The effect of several univalent cations on BADH was determined at saturating (0.5 mM BA, 1.0 mM NAD⁺) and subsaturating (0.025 mM BA, 0.025 mM NAD⁺) substrate concentrations (Fig. 6). At saturating concentrations of substrates, KCl had a slight activating effect upon BADH activity. The maximum effect of this cation was observed at 400 mM where it increased the enzyme activity about 25% (Fig. 6 A). NaCl up to 150 mM had no effect, while it inhibited at higher concentrations. NH₄Cl was inhibitory at all the concentrations tested. The effect of these ions at subsaturating concentrations of substrates, which more likely are closer to the *in vivo* concentrations than the saturating ones, were more drastic (Fig. 6 B). K⁺ increased the activity 100% at 50 mM and 50% at 150 mM. Even though increasing the concentration of KCl above 50 mM led to activities lower than those obtained at concentrations below 50 mM, it is interesting that only at very high concentrations of this ion, 400 mM, the activity was 10% lower than in the absence of added KCl. Under conditions of low substrate concentrations, the inhibitory effect of Na⁺ was observed at all the concentrations tested. The enzyme was totally inhibited when 300 mM NaCl was included in the assay medium. NH₄⁺ was found to be an even more potent inhibitor of amaranth BADH, total inhibition being observed at 150 mM of this ion. These results indicate that ionic effects are not due to ionic strength, rather that specific effects seem to be operating, although it is difficult to assess the physiological significance of some of these effects. Since many plant cells accumulate K⁺ during water stress (Hanson and Hitz, 1982), this ion may play a significant role in regulating the BADH activity during water stress in amaranth leaves. It is known that under nonstressed conditions the K⁺ concentration inside spinach chloroplasts is 180 mM (Schroppe-Meier and Kaiser, 1989), and that under water- or salt-stress the concentration of this ion increases (Hanson and Hitz, 1982; Schroppe-Meier and Kaiser, 1989). It is therefore of interest that amaranth-BADH is activated at the physiological concentration of this ion and that it has a high tolerance to high K⁺ even at low substrate concentrations. Regarding the inhibitory effects of sodium, one may question any physiological significance of it given the very low concentrations of Na⁺ in the chloroplast (7 mM) under non-stress or water- or salt-stress conditions (Schroppe-Meier and Kaiser, 1989). On the other hand, the concentration of ammonium ions in the whole leaf rose sharply just after amaranth leaves were subjected to water deficit, but decreased to the normal values shortly afterwards (Gamboa et al., 1991). Thus, it is possible that the *in vivo* degree of inhibition of BADH by this ion is negligible.

With respect to bivalent cations, Mg²⁺ up to 150 mM and Ca²⁺ up to 50 mM had no effect on the BADH activity (data not shown). Chelating agents, such as EDTA, had no effect on the enzyme, suggesting that BADH is not a metalloenzyme.

The effects of various organic solutes were also investigated using low and high substrate concentrations in the enzyme assay. At high substrate concentrations glycine betaine, sucrose, and proline had a slight activating effect over the range of concentrations tested. Mannitol had little effect on the enzyme activity under these conditions (Fig. 6 C).

At low substrate concentrations (Fig. 6 D), sucrose and mannitol had an activating effect on the enzyme activity giving a maximum at 50 mM. Proline was an activator too, but the maximum of activity occurred at 400 mM. Glycine betaine activated BADH slightly at 50 mM, while it was inhibitory at higher concentrations. It has been observed that amaranth leaves under water stress accumulated proline and glycine betaine (Gamboa et al., 1991). In salt-stressed spinach leaves the concentration of glycine betaine in the chloroplast increases up to 300 mM (Robinson and Jones, 1986). Therefore, if similar concentrations are reached in amaranth chloroplasts under water deficit, the BADH activity will be severely inhibited unless there is some mechanism that relieves the enzyme from this inhibition, for instance the intrachloroplastic BADH concentration or the presence of some metabolites or ions. To clarify this point, further work on the mechanism of inhibition by glycine betaine would be necessary.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. J. Sarquis for critically reading the manuscript. This work was partially supported by a grant from Universidad Nacional Autónoma de México (PADEP-DFQ-9141). EMVS was a recipient of a CONACYT-53280 fellowship.

References

- ARAKAWA, K., T. TAKABE, T. SUGIYAMA, and T. AKAZAWA: Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* 101, 1485–1488 (1987).
- ARAKAWA, K., M. KATAYAMA, and T. TAKABE: Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol.* 31, 797–803 (1990).
- ARAKAWA, K., K. MIZUNO, S. KISHITANI, and T. TAKABE: Immunological studies of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol.* 33, 833–840 (1992).
- BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254 (1976).
- CLELAND, W. W.: Statistical analysis of enzyme kinetic data. In: COLLOWICK, S. P., N. O. KAPLAN, and D. L. PURICK (eds.) *Methods in Enzymology*, Vol. 63, pp. 103–138. Academic Press, New York (1979).
- ELLMAN, G. L.: Tissue Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77 (1959).
- FALKENBERG, P. and A. R. STROM: Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 253–259 (1990).

- GAMBOA, A., E. M. VALENZUELA, and E. MURILLO: Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. J. Plant Physiol. 137, 586-590 (1991).
- HANSON, A. D. and N. A. SCOTT: Betaine synthesis from radioactive precursors in attached, water-stressed barley leaves. Plant Physiol. 66, 342-348 (1980).
- HANSON, A. D. and W. A. HITZ: Metabolic Responses of mesophytes to plant water deficits. Annu. Rev. Plant Physiol. 33, 163-203 (1982).
- HANSON, A. D., A. M. MAY, R. GRUMET, J. BODE, G. C. JAMESON, and D. RHODES: Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 3678-3682 (1985).
- IBARRA-CABALLERO, J., C. VILLANUEVA-VERDUZCO, J. MOLINA-GALAN, and E. SANCHEZ DE JIMENEZ: Proline accumulation as a symptom of drought stress in maize: a tissue differentiation requirement. J. Exp. Bot. 39, 889-897 (1988).
- JAKOBY, W. B.: Aldehyde Dehydrogenase. In: BOYER, LARDY, and MYRBACK (eds.). The Enzymes, 2nd edition, Vol. 7, pp. 203-221. Academic Press, New York (1963).
- LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 277, 680-685 (1970).
- LEATHERBARROW, R. J.: Enzfiter, Elsevier Biosoft (1987).
- MELCHIOR, W. B. and O. FAHRNEY: Ethoxyformylation of proteins. Reaction of ethoxyformic anhydride with α -chymotrypsin, pepsin, and pancreatic ribonuclease at pH 4. Biochemistry 9, 251-258 (1970).
- MONEY, K. P.: Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols. Plant Physiol. 91, 766-769 (1989).
- MORI, N., B. KAWAKAMI, K. HYAKUTOME, Y. TANI, and H. YAMADA: Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum didymum* M-1. Agric. Biol. Chem. 44, 3015-3016 (1980).
- NAGASAWA, T., Y. KAWABATA, Y. TANI, and K. OGATA: Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. Agr. Biol. Chem. 40, 1743-1749 (1976).
- OGILVIE, J. W. and S. C. WHITAKER: Reaction of Tris with aldehydes. Effect of Tris on reactions catalyzed by homoserine dehydrogenase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 445, 525-536 (1976).
- PAN, S., R. A. MOREAU, C. YU, and A. H. C. HUANG: Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase. Plant Physiol. 67, 1105-1108 (1981).
- RAO, J. G. S., C. T. KONG, R. C. BENJAMIN, B. G. HARRIS, and P. F. COOK: Modification of an arginine residue essential for the activity of NAD-malic enzyme from *Acaris suum*. Arch. Biochem. Biophys. 255, 8-13 (1987).
- RUORDAN, J. F.: Functional arginyl residues in carboxypeptidase A. Modification with butanedione. Biochemistry 12, 3915-3923 (1973).
- RIVETT, A. J. and K. J. TIPTON: Kinetic studies with Rat-Brain succinic-semialdehyde dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 117, 187-193 (1981).
- ROBINSON, S. P. and G. P. JONES: Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress. Aust. J. Plant Physiol. 13, 659-668 (1986).
- SATYA NARAYAN, V. and P. M. NAIR: Potato tuber succinate semialdehyde dehydrogenase: Purification and characterization. Arch. Biochem. Biophys. 275, 469-477 (1989).
- SCHROFFEL-MEIER, G. and M. M. KAISER: Ion homeostasis in chloroplasts under salinity and mineral deficiency. Plant Physiol. 87, 822-827 (1988).
- SEGEL, I. H.: Kinetics of unreactant enzymes. In: Enzyme kinetics, pp. 18-89. John Wiley and Sons, New York (1975).
- WEETILNYK, E. A. and A. D. HANSON: Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: Purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity. Arch. Biochem. Biophys. 271, 56-63 (1989).
- - Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2745-2749 (1990).
- WRAY, W., T. BOULIKAS, V. P. WRAY, and R. HANCOCK: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 118, 197-203 (1981).
- WYN JONES, R. G. and R. STOREY: Betaines. In: Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants (PALEG, L. G. and D. ASPINALL, eds.). Academic Press, Sydney, pp. 171-204 (1981).
- WYN JONES, R. G. and J. GORHAM: Osmoregulation. In: LANGE, O. L., P. S. NOBEL, C. B. OSMOND, and H. ZIEGLER (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology, NS, Vol. 12C, pp. 35-58. Springer-Verlag, Berlin (1983).
- YANCEY, P. H., M. E. CLARK, S. C. HAND, R. D. BOWLUS, and G. M. SOMERO: Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science 217, 1214-1222 (1982).

Betaine-aldehyde Dehydrogenase from Leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. Exhibits an Iso Ordered Bi Bi Steady State Mechanism*

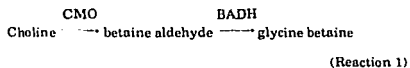
(Received for publication, May 3, 1993)

Elisa M. Valenzuela-Soto and Rosario A. Muñoz-Clares†

From the Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, 04510, México

The kinetics of the oxidation of betaine aldehyde catalyzed by NAD⁺-betaine-aldehyde dehydrogenase, purified from amaranth leaves subjected to water deficit, were analyzed by steady state initial velocity and product and dead-end inhibition studies at low substrate concentrations. Only one product, NADH, gives inhibition. The other product of the reaction, glycine betaine, does not inhibit the enzyme even at concentrations as high as 10 mM. In dead-end inhibition experiments, AMP and choline were used as dead-end analogs of NAD⁺ and betaine aldehyde, respectively. The families of double-reciprocal plots in the range 0.010–0.500 mM NAD⁺ and 0.025–0.300 mM betaine aldehyde are linear and intersect at the left of the 1/v axis. NADH is a mixed inhibitor against NAD⁺ and betaine aldehyde. AMP is competitive with respect to NAD⁺ and mixed with betaine aldehyde. Choline is competitive against betaine aldehyde and uncompetitive with respect to NAD⁺. Our results are consistent with an Iso Ordered Bi Bi steady state mechanism in which NAD⁺ is the first substrate to bind to the enzyme and NADH is the last product to dissociate from it. To our knowledge, this is the first time that an Iso mechanism has been demonstrated by product inhibition studies, as predicted by Cleland (Cleland, W. W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104–137).

Glycine betaine (GB)¹ is a major cytoplasmic osmoticum accumulated under water or salt stress in higher plants, bacteria, algae, and marine animals (1–6). The final step in the synthesis of GB from choline is catalyzed by betaine-aldehyde dehydrogenase (EC 1.2.1.8) (7), according to the following sequence of reactions.



Due to the relevant role of betaine-aldehyde dehydrogenase in the response of organisms to osmotic stress, the enzyme has been focus of much investigation. Thus, this dehydrogenase has been purified to homogeneity from *Pseudomonas* (8), spinach

leaves (9, 10), *Escherichia coli* (11), *Xanthomonas translucens* (12), and amaranth leaves subjected to water deficit.² Moreover, the primary sequence of spinach leaf betaine-aldehyde dehydrogenase is known (17).

However, kinetic studies on betaine-aldehyde dehydrogenase are scarce. The enzyme from all the sources studied to date has been found to be highly specific for betaine aldehyde (8, 10–15), but although the enzyme from plants (10, 14) and bacteria (8, 11, 12) can use NAD⁺ or NADP⁺ as cofactor, the enzyme from the fungus *Cylindrocarpum didymum* uses only NAD⁺ (13). Several groups of workers have determined apparent K_m values for betaine aldehyde (8, 11–14) and for NAD⁺ and NADP⁺ (8, 10–15). Also it has been reported previously that the enzyme from bacteria (11) and from animals (16) exhibits substrate inhibition and that the reaction is irreversible (11, 14).

To our knowledge the kinetic mechanisms of only the *E. coli* (11) and the *C. didymum* (13) enzymes have been studied to date and in both cases were found to be a ping-pong mechanism, according to Cleland's nomenclature (18). The latter is a surprising finding based on the chemistry of the aldehyde dehydrogenases and contrasts with the known sequential kinetic mechanism of aldehydes dehydrogenases from other sources (19–22). In view of the discrepancy in mechanism, it is of interest to elucidate the kinetic mechanism for betaine-aldehyde dehydrogenase from plants as an important step toward the understanding of this enzyme.

We report here the results of initial velocity and product and dead-end inhibition studies of amaranth leaf betaine-aldehyde dehydrogenase, carried out at subinhibitory BA concentrations. An Iso Ordered Bi Bi steady state mechanism is proposed here.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Biochemicals—Betaine aldehyde chloride, NAD⁺, NADH, AMP, glycine betaine, choline chloride, and Hepes were obtained from Sigma. All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Enzyme Preparation—Betaine-aldehyde dehydrogenase from *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves was purified as described elsewhere.² The enzyme was homogeneous by the criterion of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and silver staining (24) of the gels. The final specific activity of the enzyme preparation used was 1.2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ assayed at 30 °C using 100 mM Hepes buffer, pH 8.0, 0.5 mM BA and 1.0 mM NAD⁺.

Enzyme Assay—Betaine-aldehyde dehydrogenase activity was assayed spectrophotometrically measuring NAD⁺ reduction by the increase in extinction at 340 nm in a Beckman DU-65 spectrophotometer. Assay mixtures contained, in a final volume of 0.4 ml, fixed concentrations of NAD⁺ and increasing concentrations of BA, or vice versa, in 100 mM Hepes buffer, pH 8.0, containing 1 mM EDTA. The reaction was started by the addition of enzyme (0.5 μg). Temperature was maintained at 30 °C using a circulating water bath with the capacity to heat

* This research was partially funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant CONACYT-1713-N9209 and Universidad Nacional Autónoma de México Grant PADEF DFG9250. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, México City, 04510, México. Tel.: 525-622-5276; Fax: 525-622-5329.

¹ The abbreviations used are: GB, glycine betaine; BA, betaine aldehyde; CMO, choline monoxygenase.

² Valenzuela, E. M., and Muñoz-Clares, R. A. (1993) *Plant Physiol. (Bethesda)*, in press.

and cool the thermospacers of the cell compartment. The concentrations of NAD⁺, BA, NADH, and AMP used are specified for each experiment. Reaction rates were linear over the 5-min assay period. Each determination was performed in duplicate. Rates in the absence of substrates were negligible.

Data Analysis—Kinetic data were analyzed in two steps. First, experimental data at fixed concentration of one substrate and varying concentration of the second were fitted to the Michaelis-Menten equation (Equation 1), by using the nonlinear regression analysis program of R. J. Leatherbarrow (Enzfitter, Elsevier-Biosoft). Next, the apparent kinetic constants obtained from these plots were fitted using the equation of a rectangular hyperbola in the case of data conforming to a sequential bi-bi mechanism to determine K_m (Equation 2), K_s (Equation 3), K_{iA} (Equation 4), and to Equations 5 and 6 to determine the inhibition constant for the dead-end analogs AMP and choline, respectively (18, 23).

$$v = \frac{V_{app}[A]}{K_m + [A]} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$(V/K_m)_{app(B)} = \frac{(V/K_s)[A]}{K_s + [A]} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$V_{app(B)} = \frac{V[A]}{K_s + [A]} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$V_{app(A)} = \frac{V[B]}{K_i + [B]} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$(K_m/V)_{app(A)} = \frac{K_s}{V} \left(1 + \frac{K_m K_s}{K_i [B]} \right) \left(1 + \frac{[AMP]}{K_{i(AMP)}} \right) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$(K_m/V)_{app(B)} = \frac{K_s}{V} \left(1 + \frac{K_m}{K_{i(choline)}} \right) \quad (\text{Eq. 6})$$

where V is the maximum velocity; A , B , and I are the concentrations of the two substrates and inhibitor, respectively; K_m and K_s are Michaelis-Menten constants for the substrates A and B ; K_m is the dissociation constant for substrate A ; $K_{i(AMP)}$ and $K_{i(choline)}$ are the competitive inhibition constants for AMP and choline, respectively. The nomenclature used is that of Cleland (18).

The iso inhibition constants K_{iA} and K_{iB} for NADH (Q) were determined by plots of the slopes $_{(A)}$ and intercepts $_{(A)}$ versus $[Q]$, respectively, according to Equations 7 and 8, deduced from the initial velocity equation for an Iso Ordered Bi Bi steady state mechanism when A is the variable substrate and Q is present, shown under "Results and Discussion" (Equation 10).

$$(K_m/V)_{app(A)} = \left(\frac{K_s}{V} \right) \left(1 + \frac{K_m K_s}{K_i [B]} \right) \left(1 + \frac{[Q]}{K_{iQ}} \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

$$(1/V)_{app(A)} = \frac{1}{V} \left(1 + \frac{K_m}{[B]} + \frac{[Q]}{K_{iQ}} \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

RESULTS AND DISCUSSION

Initial Velocity Studies—The reaction catalyzed by betaine-aldehyde dehydrogenase is experimentally irreversible, and therefore kinetic analysis is limited to initial velocity studies of the forward reaction in the absence and presence of inhibitors, i.e. neither the reverse reaction nor isotopic exchange between products and substrates can be demonstrated.

The enzyme reaction was analyzed in a systematic manner from secondary replots as described under "Materials and Methods." Initial velocity patterns were obtained by measuring betaine-aldehyde dehydrogenase activity varying the levels of NAD⁺ or BA at several fixed concentrations of the other. Since the enzyme is subjected to substrate inhibition by BA (11, 16), in these experiments we used concentrations of this substrate in a subinhibitory range. We found that BA concentrations can be varied over a reasonably broad range before substrate inhibition complicates the diagnostic initial velocity plots. Plots of

velocity (v) versus $[NAD^+]$ or v versus $[BA]$ in the range 0.01–0.30 mM BA and 0.05–0.50 mM NAD⁺ followed Michaelis-Menten kinetics (not shown). The corresponding families of double-reciprocal plots were linear and gave normal intersecting patterns (Figs. 1 and 2). By this way a ping-pong mechanism is ruled out, and the kinetic mechanism of betaine-aldehyde dehydrogenase should be sequential, either a Steady State Ordered, a Steady State Ordered Theorell-Chance, or a Rapid Equilibrium Random Bi Bi mechanism (18, 23). These results also exclude a sequential rapid equilibrium ordered mechanism, since the lines in the reciprocal plots intersect at the left of the $1/v$ axis. The slope and intercept replots were always linear (inset Figs. 1 and 2), yielding the kinetic constants included in Table I.

Therefore, the mechanism of the amaranth enzyme differs from the ping-pong mechanism proposed by others for the bacterial (11) and fungal (13) enzymes. These enzymes are tetrameric, whereas plant betaine-aldehyde dehydrogenases are dimeric (9, 10). They also exhibited much higher values for $K_m(BA)$, $K_m(NAD)$, and V_{max} than those reported here. It is difficult to attempt to rationalize the differences in the kinetic mechanism of betaine-aldehyde dehydrogenase from different sources, but it appears that a generalization regarding the reaction mechanism of betaine-aldehyde dehydrogenases cannot be made.

Product Inhibition Studies—In order to establish the order of substrate addition and product release and to discriminate between the possible kinetic mechanisms suggested by the initial velocity studies, product inhibition studies with NADH were performed. The other product of the reaction, GB, does not inhibit at any of the concentrations tested, up to 10 mM. The family of double-reciprocal plots in which the concentration of NAD⁺ was varied in the range 0.05–0.20 mM at different levels of NADH (25–200 μ M) and a fixed subinhibitory level of BA (100 μ M) is shown in Fig. 3. The inhibition by NADH is mixed with respect to NAD⁺ which is indicative either of the binding of NADH to an enzyme form different from the one to which NAD⁺ is binding or of the existence of a different binding site for NADH. This pattern of inhibition excludes the Rapid Equilibrium Random Bi Bi mechanism suggested by the initial velocity studies carried out in the absence of products, since in this mechanism competitive inhibition by the product with respect to both substrates should be observed (18, 23). Even if a

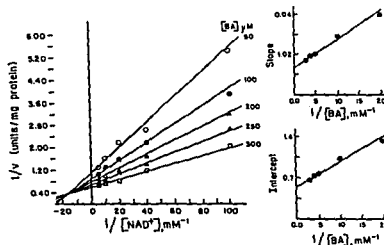


Fig. 1. Initial velocity patterns for the betaine-aldehyde dehydrogenase reaction at subinhibitory BA concentrations. NAD⁺ was varied at the following fixed concentrations of BA: \circ , 50 μ M; \bullet , 100 μ M; Δ , 200 μ M; \blacktriangle , 250 μ M; and \square , 300 μ M. Inset, slope and $1/v$ axis intercept versus $[BA]$. An enzyme concentration of 1.25 μ g ml⁻¹ was used for each assay. In the double-reciprocal plots the points drawn are the experimentally determined values, whereas the lines drawn through these points are the calculated from the best fit of these data to Equation 1.

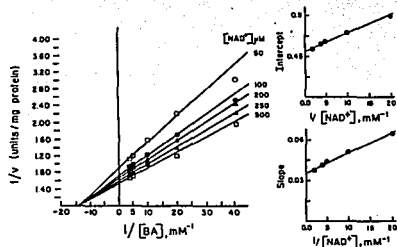


FIG. 2. Initial velocity patterns for the betaine-aldehyde dehydrogenase reaction at subinhibitory BA concentrations. BA was varied at the following fixed concentrations of NAD^+ : \circ , 50 μM ; \bullet , 100 μM ; Δ , 200 μM ; \blacktriangle , 250 μM ; and \square , 500 μM . *Inset*, $1/v$ axis intercept versus $1/[\text{NAD}^+]$. Other conditions were the same as those described in Fig. 1.

TABLE I
Kinetic constants of betaine-aldehyde dehydrogenase from
A. hypochondriacus L.

The values given were computed by nonlinear regression fit of the data presented in the corresponding figures to the equations described under "Material and Methods."

Constant	Value
$K_m(\text{NAD})$	$39.5 \pm 3.6 \mu\text{M}$
K_m	$40.1 \pm 6.0 \mu\text{M}$
$K_m(\text{HA})$	$56.1 \pm 6.1 \mu\text{M}$
V_{max}	$1.97 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg protein}$
K_{iq}	$50.7 \pm 6.3 \mu\text{M}$
K_{iiq}	$118.6 \pm 20.4 \mu\text{M}$
$K_{i, \text{AMP}}/(\text{NAD})$	$896 \pm 60 \mu\text{M}$
$K_{i, \text{choline}}/(\text{BA})$	$4.10 \pm 0.61 \text{ mM}$

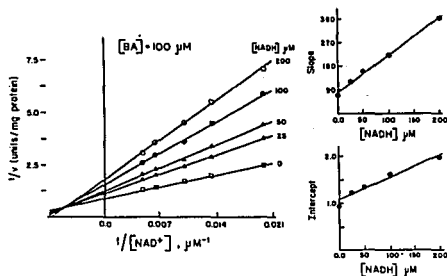


FIG. 3. The kinetics of inhibition of the betaine-aldehyde dehydrogenase reaction by NADH at subinhibitory BA concentrations. $1/v$ versus $1/[\text{NAD}^+]$ at 0.1 mM BA and the following fixed concentrations of NADH: 0 (\square), 25 (\blacktriangle), 50 (Δ), 100 (\bullet), and 200 (\circ) μM . *Inset*, slope and $1/v$ axis intercept versus $1/[\text{NADH}]$. Other conditions were the same as those described in the legend to Fig. 1.

dead-end EBQ complex is formed, NADH should be a competitive inhibitor against NAD^+ . The mixed inhibition of NADH against NAD^+ can be explained in terms of an ordered mechanism in which NAD^+ is the second substrate to bind to the enzyme and NADH the first product released or in terms of an Iso Ordered Bi Bi Steady State mechanism, with NAD^+ as the first substrate and NADH as the last product, and in which after the release of NADH there is isomerization of a stable enzyme form (18, 23). This is because the isomerization of transitory enzyme forms do not affect the rate equation, whereas the isomerization of a stable form introduces additional terms

in the denominator of the rate equation when products are present, giving rise to mixed inhibition of the last product with respect to the first substrate (18, 23).

An ordered mechanism with formation of a binary complex between enzyme and aldehyde followed by formation of a ternary complex with NAD^+ has been found in yeast aldehyde dehydrogenase (19). In the case of the betaine-aldehyde dehydrogenase reaction, the first of the two possibilities pointed out necessarily imply that the irreversible step would occur after the release of NADH, since the point of addition of NAD^+ must be connected by reversible steps with the point of addition of NAD^+ . Therefore, NADH must be the first product to leave the enzyme and the irreversible step would be the release of GB, which is supported by the failure of this compound to act as inhibitor of the reaction. However, the oxidation step is thought to be irreversible in the case of aldehyde dehydrogenases, which strongly argues against this mechanism. Thus, our results are most consistent with the Iso mechanism.

The inhibition by NADH was linear, as can be seen in the replots of the slopes and intercepts from Fig. 3 versus NADH concentration (*inset* of Fig. 3). From these replots values for K_{iiq} and $K_{i, \text{AMP}}$ were calculated (Table I), assuming the Iso Ordered Bi Bi Steady State mechanism and using Equations 7 and 8 described under "Materials and Methods."

With BA as the variable substrate, in a subinhibitory concentration range (0.025–0.200 mM), NADH is a mixed type inhibitor when NAD^+ was kept at subsaturating concentrations (100 μM) (Fig. 4). These results are consistent with any of the two mechanisms suggested by the product inhibition studies with NAD^+ as variable substrate and therefore cannot discriminate between them. The replots of both the intercepts and slopes versus NADH concentration show linear inhibition (*inset* of Fig. 4).

Dead-end Inhibition Studies—The product inhibition studies were inconclusive with respect to the order of addition of substrates, and because of that we tried to resolve this question by using AMP and choline as dead-end analogs of NAD^+ and BA, respectively.

With NAD^+ as the variable substrate, AMP gave a competitive inhibition pattern (Fig. 5), whereas it was found to be a mixed inhibitor with respect to BA (Fig. 6). Secondary intercepts and slope replots are linear in both cases (*inset* Figs. 5 and 6). These results rule out any Ordered Bi Bi mechanism in which BA is the first substrate to add to the free enzyme, given that if BA were the first substrate, AMP would be uncompetitive with respect to it. The results are most consistent with the

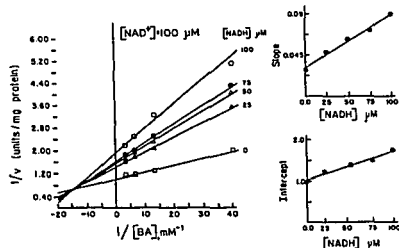


FIG. 4. The kinetics of inhibition of the betaine aldehyde dehydrogenase reaction by NADH at subinhibitory BA concentrations. $1/v$ versus $1/[\text{BA}]$ at 0.1 mM NAD^+ and different fixed concentrations of NADH: 0 (\square), 25 (\blacktriangle), 50 (Δ), 75 (\bullet), and 100 (\circ) μM . *Inset*, slope and $1/v$ axis intercept versus $1/[\text{NADH}]$. Other conditions were the same as those described in the legend to Fig. 1.

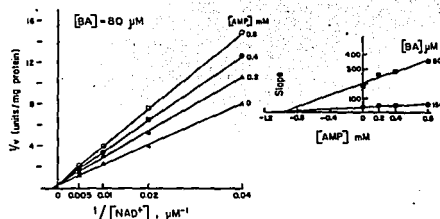


FIG. 5. The kinetics of inhibition of the betaine-aldehyde dehydrogenase reaction by AMP at different fixed concentrations of AMP and a constant concentration of BA (80 μM). AMP concentrations were: 0 (\blacktriangle), 0.2 (\triangle), 0.4 (\bullet), and 0.8 (\circ) μM . Inset, slope of the two families of double-reciprocal plots obtained at two fixed BA concentrations (80 and 150 μM) versus [AMP].

Iso Ordered Steady State mechanism in which NAD^+ binds first to the enzyme, giving additional support to our conclusion above that the Ordered Steady State mechanism in which NAD^+ binds second to the enzyme is not operating, but cannot distinguish between this ordered mechanism and a rapid equilibrium mechanism.

AMP at the concentrations used in this study only binds to the form of the free enzyme that binds NAD^+ and not to the form of the free enzyme that binds NADH, as shown by the competitive inhibition pattern with respect to NAD^+ .

Choline, the dead-end analog of BA used, was competitive against BA and uncompetitive against NAD^+ (Figs. 7 and 8), as expected for an ordered mechanism in which BA binds after NAD^+ . These results unequivocally distinguish between the ordered and the random mechanism, and confirm our conclusion, derived from the product inhibition studies above, that the enzyme does not follow a Rapid Equilibrium Random mechanism.

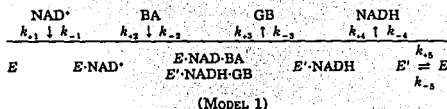
Further evidence of the order of addition of substrates was obtained in additional experiments in which we carried out the AMP inhibition studies using NAD^+ as the variable substrate as before, but at a different BA concentration. The pattern of the computer-fitted family of double-reciprocal plots was similar to the one shown in Fig. 5. The corresponding computer-derived two best fit slope/ $1/\text{NAD}$ replots when drawn against the respective AMP concentrations intersect in the *abscissa* to the left of the $1/v$ axis, as shown in the inset of Fig. 5. In other words, we determined $K_{i(\text{AMP})}$ at two levels of BA, and the constant values obtained identify the mechanism as Ordered, since a changing value would be obtained in the case of a Rapid Equilibrium Random mechanism (18, 23).

The inhibition constants for AMP and choline computed from Figs. 5 and 8, respectively, are given in Table I.

In conclusion, the simplest model that accounts for the inhibition studies and for the initial velocity patterns reported in this paper is an Iso Ordered Bi Bi Steady State mechanism, where NAD^+ is the first substrate to combine with the enzyme and NADH is the last product released. Iso mechanisms that involve the isomerization of stable forms of the enzyme were postulated by Cleland (18). Fisher *et al.* (30) proposed that an isomerization step from the free enzyme that liberates product to the form that binds substrate occurs in the reaction catalyzed by proline racemase, but, to our knowledge, our work is the first that gives kinetic evidence of such an Iso mechanism based on product inhibition studies.

The kinetic model for the Steady State Iso Ordered mecha-

nism with its corresponding equations is as follows.



In the absence of products, the velocity equation for this mechanism is the same as that of a Steady State Ordered Bi Bi mechanism (Equation 9) (18, 23),

$$v = \frac{V_1[A][B]}{K_m K_s + K_s[A] + K_s[B] + [A][B]} \quad (\text{Eq. 9})$$

but in the presence of NADH (Q), the velocity equations in reciprocal form become the following.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V_1} \left(1 + \frac{[Q]}{K_m} \right) \left(1 + \frac{K_m K_s}{K_s[B]} \right) \frac{1}{[A]} + \frac{1}{V_1} \left(1 + \frac{K_s}{[B]} \right) \frac{[Q]}{K_m} \quad (\text{Eq. 10})$$

$$\frac{1}{v} = \frac{K_s}{V_1} \left(1 + \frac{K_m}{[A]} \right) \left(1 + \frac{[Q]}{K_m} \right) \frac{1}{[B]} + \frac{1}{V_1} \left(1 + \frac{K_s}{[A]} \right) \left(1 + \frac{[Q]}{K_m} + \frac{[Q]}{K_s} \right) \quad (\text{Eq. 11})$$

In an Iso Ordered Bi Bi Steady State mechanism $K_{i(\text{A})}$ is not the dissociation constant of A, NAD^+ in this case, from the free enzyme, but rather a more complex inhibition constant defined by the following.

$$K_{i(\text{A})} = \frac{k_{-1} + k_{-6}}{k_{-1}} \quad (\text{Eq. 12})$$

Also, in this mechanism, the competitive inhibition constant for NADH, $K_{i(\text{Q})}$, is not the dissociation constant of NADH from free enzyme, E' in this case. Assuming only one central complex as before, it can be deduced that it is composed of the following rate constants.

$$K_{i(\text{Q})} = \frac{k_{-4}}{k_{-4}} \left(1 + \frac{k_{-6}}{k_{-5}} \right) \quad (\text{Eq. 13})$$

The uncompetitive inhibition constant for NADH when NAD^+ is the variable substrate is now an iso inhibition constant, $K_{i(\text{iso})}$, which in the case of an Iso Ordered Bi Bi mechanism, is defined by the following rate constants, assuming as before only a central complex.

$$K_{i(\text{iso})} = \frac{k_{-4}}{k_{-4}} \left(1 + \frac{k_{-6}}{k_{-5}} \right) + \frac{k_{-5}}{k_{-4}} \quad (\text{Eq. 14})$$

It is not then possible to estimate the dissociation constant for the betaine-aldehyde dehydrogenase- NAD^+ or the betaine-aldehyde dehydrogenase-NADH complex from kinetic studies, which makes it difficult to evaluate the role of NADH on the regulation of the activity of the enzyme. However, it has been found in whole wheat leaves subjected to water stress that the relative content of NAD^+ increased, whereas that of NADH decreased (27). If this pattern of evolution is general in plants, we may speculate that under these conditions the NAD^+ redox ratio would favor the synthesis of GB.

The chemical basis of the isomerization step is not known yet. We may speculate, given the known chemistry of other aldehyde dehydrogenases, that two groups may be involved in general acid-general base catalysis, one protonated, which will perform the protonation of the carbonyl oxygen, and other unprotonated, which will achieve the deprotonation of the lytic H_2O . In fact, the pH dependence of the velocity showed that two groups, one protonated and the other unprotonated, is required for amaranth leaf betaine-aldehyde dehydrogenase activity.² One of them, the protonated one, may well be the sulphydryl

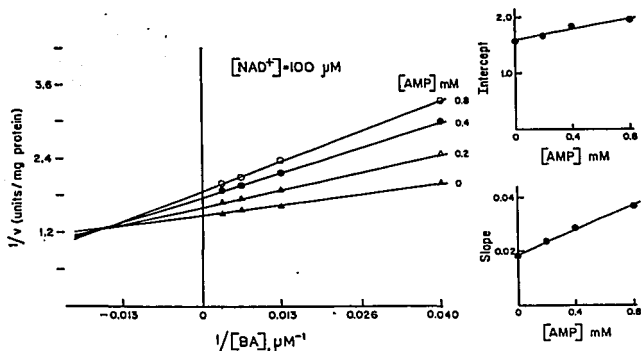


Fig. 6. The kinetics of inhibition of the betaine-aldehyde dehydrogenase reaction by AMP at subinhibitory BA concentrations. $1/v$ versus $1/[BA]$ at different fixed concentrations of AMP and a constant concentration of NAD^+ ($100 \mu M$). AMP concentrations were: 0 (Δ), 0.2 (\triangle), 0.4 (\bullet), and 0.8 (O) mM. Inset, slope and $1/v$ axis intercept versus [AMP]. Other conditions were the same as those described in the legend to Fig. 1.

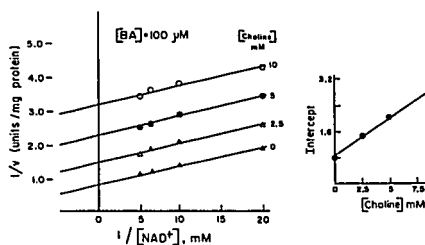


Fig. 7. The kinetics of inhibition of the betaine-aldehyde dehydrogenase reaction by choline at subinhibitory BA concentrations. $1/v$ versus $1/[NAD^+]$ at different fixed concentrations of choline and a constant concentration of BA ($100 \mu M$). Choline concentrations were: 0 (Δ), 2.5 (\triangle), 5 (\bullet), and 10 (O) mM. Inset, $1/v$ axis intercept versus [choline]. Other conditions were the same as those described in the legend to Fig. 1.

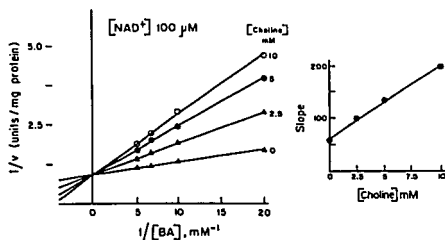
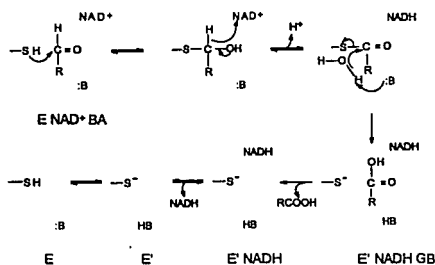


Fig. 8. The kinetics of inhibition of the betaine-aldehyde dehydrogenase reaction by choline at subinhibitory BA concentrations. $1/v$ versus $1/[BA]$ at different fixed concentrations of choline and a constant concentration of NAD^+ ($100 \mu M$). Choline concentrations were: 0 (Δ), 2.5 (\triangle), 5 (\bullet), and 10 (O) mM. Inset, slope versus [choline]. Other conditions were the same as those described in the legend to Fig. 1.



SCHEME 1. Proposed mechanism for amaranth betaine aldehyde dehydrogenase.

group that it is known to form the thiohemiacetal intermediate in other aldehyde dehydrogenases (25, 28, 29). It is then possible that the protonation state of these groups of the enzyme after a catalytic cycle and release of products differs from the one before the addition of the substrates and that conversion to the form that binds substrates, necessary for the beginning of a new catalytic cycle, or the conformational change associated with it, is a slow step of the reaction. This proposed mechanism for amaranth betaine-aldehyde dehydrogenase is shown in Scheme 1. Similarly, the Iso mechanism proposed by Fisher *et al.* (30) involved protonation and deprotonation of the two catalytic bases after the release of the product to return to the form of the enzyme that binds substrate. This possibility is currently under investigation.

Finally, the lack of inhibition by the acid seems to be a common property of aldehyde dehydrogenases (19–21, 25). There are two possibilities for the lack of binding of GB to the complex $E-NADH$: first, the release of GB from the enzyme is irreversible; second, the transitory complex to which GB binds, the complex $E-NADH$, may not represent a significant fraction of the total enzyme in the absence of added NADH. However, we think that the steady state level of enzyme-NADH available for combination with the acid to give the enzyme-GB-NADH is

high enough, as suggested by the binding of BA to enzyme-NADH to give a dead end complex.³ Therefore, the first is the more likely explanation. The charge of the acid may account for the incapability of GB to bind to any form of the enzyme. The fact that GB does not inhibit the forward reaction even at high concentrations may have physiological relevance, since this metabolite reached very high intrachloroplastic levels (up to 300 mM) in response to water or salt stress (6, 26).

Acknowledgment—We thank Professor Paul F. Cook for helpful discussion and critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Wyn Jones, R. G., and Storey, R. (1981) in *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* (Paleg, L., and Aspinall D. eds) pp. 171-204, Academic Press, Sydney
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., and Somero, G. N. (1982) *Science* 217, 1214-1217
- Hanson, A. D., and Hitz, W. D. (1982) *Annu. Rev. Plant Physiol.* 33, 163-203
- Imhoff, J. F., and Rodriguez-Valera, F. (1984) *J. Bacteriol.* 160, 478-479
- McDonnell, E., and Wyn Jones, R. G. (1988) *J. Exp. Bot.* 39, 421-430
- Gambon, A., Valenzuela, E. M., and Murillo, E. (1991) *J. Plant Physiol.* 137, 586-590
- Hanson, A. D., May, A. M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G. C., and Rhodes, D. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 3678-3682
- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y., and Ogata, K. (1976) *Agric. Biol. Chem.* 40, 1743-1749
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T., and Akanawa, T. (1987) *J. Biochem. (Tokyo)* 101, 1485-1488
- Weretilnyk, E. A., and Hanson, A. D. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 66-63
- Falkenberg, P., and Strom, A. R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 253-259
- Mori, N., Yoshida, N., and Kitamoto, Y. (1992) *J. Ferment. Bioproc. Eng.* 73, 352-356
- Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y., and Yamada, H. (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44, 3015-3016
- Pan, S. M., Moreau, R. A., Yu, C., and Huang, A. H. C. (1981) *Plant Physiol.* 67, 1105-1103
- Arakawa, K., Katayama, M., and Takabe, T. (1990) *Plant Cell Physiol.* 31, 797-803
- Golberg, A. M., and McMan, R. E. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 167, 186-189
- Weretilnyk, E. A., and Hanson, A. D. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2745-2749
- Cleland, W. W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 67, 104-137
- Bradbury, S. L., and Jakoby, W. B. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 1834-1840
- Rivett, A. J., and Tipton, K. F. (1981) *Eur. J. Biochem.* 117, 187-193
- Satya Narayan, V., and Nair, P. M. (1990) *Plant Sci.* 71, 159-166
- Ryszewski, C. N., and Pietruszko, R. (1980) *Biochemistry* 19, 1843-1848
- Segel, I. H. (1975) in *Enzyme Kinetics*, pp. 767-782, John Wiley & Sons, New York
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V. P., and Hancock, R. (1981) *Anal. Biochem.* 118, 197-203
- Feldman, R. I., and Weiner, H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 267-272
- Robinson, S. P., and Jones, G. P. (1986) *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 659-658
- Zagladanska, B. (1989) *J. Plant Physiol.* 134, 320-326
- Jakoby, W. B. (1963) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Lardy, H., and Myrback, K., eds) Vol. 7, pp. 203-221, Academic Press, New York
- Dickinson, F. M. (1969) *Biochem. Soc. Trans.* 17, 299-300
- Fisher, L. M., Albery, W. J., and Knowles, J. R. (1986) *Biochemistry* 25, 2529-2537

³ E. M. Valenzuela-Soto and R. A. Muñoz-Clares, manuscript in preparation.

