

00562 2Ej 2

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO



FACULTAD DE QUIMICA

PAPEL DE LAS CISTEINAS EN LA
ACTIVIDAD DE LA BETAINA ALDEHIDO
DESHIDROGENASA DE
Pseudomonas aeruginosa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A :
BIOL. LILIAN GONZALEZ SEGURA

272993

MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Estela Sánchez de Jiménez
Vocal: Dra. Victoria Chagoya de Sánchez
Secretario: Dr. Mario Luis Calcagno Montans
Suplente: Dr. Gloria Soberón Chávez
Suplente: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

Trabajo realizado en el laboratorio de Osmorregulación, Unidad de Morfología y Función, ENEP Iztacala, UNAM y laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM. Financiado por CONACYT, proyecto 252-P-N y DGAPA, UNAM, proyecto IN-210198. La sustentante fue becaria de CONACYT y DGEP.

Asesora:

Dra. Rosario A. Muñoz Clares Rosario Muñoz Clares

Sustentante:

Biól. Lilian González Segura Lilian González Segura

A mis padres RAMÓN y EMELIA

A mi hermana IVONNE, a mi cuñado FELIPE

A mis sobrinos TANIA, FRANCISCO y MONTSERRAT

A tí, ATALO

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primeramente a la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, por su asesoramiento, dedicación y tiempo que me ha brindado a lo largo de la elaboración de este trabajo.

Al M. en C. Roberto Velasco García por sus valiosas aportaciones en la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio de Iztacala y de la Facultad de Química.

A las Dras. Estela Sánchez de Jiménez, Victoria Chagoya de Sánchez y Gloria Soberón Chávez; y a los Dres. Mario Calcagno Montans y Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, sinodales del presente trabajo, por sus valiosos comentarios.

Al CONACYT y a la DGEF por haberme otorgado la beca para la realización de mis estudios de Maestría.

A mis amigos Ivonne Olivares Corichi, Alicia Ochoa Sánchez y Arturo Lozano Ramírez, por su amistad.

A mi hermana, mi cuñado y mis sobrinos, por su apoyo, consejos y cariño.

De forma muy especial a mis padres, por todo lo que me han dado, ya que sin ustedes no hubiera podido llegar a alcanzar mis metas.

A Atalo, por apoyarme y compartir conmigo todo.

Abreviaturas

| | |
|---------------------|--|
| ABA | Ácido abscísico |
| As | Arsenito |
| BA | Betaína aldehído |
| BADH | Betaína aldehído deshidrogenasa |
| BAL | 2, 3 dimercaptopropanol |
| cDNA | ADN complementario al ARN mensajero |
| Cu(OP) ₂ | Cobre-(o-fenantrolina) ₂ |
| DTNB | ácido 5, 5'-ditiobis 2 nitrobenzoico |
| DTT | Ditiotreitól |
| EDTA | Ácido etilén-diamino-tetracético |
| MMTS | Ácido metilmetanotiosulfonato |
| NAD ⁺ | Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado |
| NADH | NAD ⁺ reducido |
| NADP ⁺ | Dinucleótido de nicotinamida y adenina-3-fosfato oxidado |
| NADPH | NADP ⁺ reducido |
| NEM | N-etilmaleimida |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN | 4 |
| I. INTRODUCCIÓN | 5 |
| II. ANTECEDENTES | 9 |
| II. 1. Betaína aldehído deshidrogenasa | 9 |
| II. 1. 1. Propiedades fisico-químicas..... | 10 |
| II. 1. 2. Estructura | 11 |
| II. 1. 4. Propiedades cinéticas | 11 |
| A) Especificidad de sustratos..... | 11 |
| B) Mecanismo cinético | 13 |
| II. 1. 4. Mecanismo de reacción..... | 16 |
| II. 1. 5. Aminoácidos esenciales | 17 |
| II. 1. 6. Función biológica..... | 18 |
| II. 1. 7. Regulación de la expresión génica y de la actividad de BADH..... | 19 |
| II. 2. Modificación química | 21 |
| II. 2. 1. Modificación química de cisteínas..... | 22 |
| A) Reactivos específicos para monotioles | 22 |
| B) Reactivos específicos para sulfhidrilos vecinales | 24 |
| II. 2. 2. Modificación química de cisteínas de aldehído deshidrogenasas..... | 25 |
| III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 27 |
| IV. HIPÓTESIS | 27 |
| V. OBJETIVOS | 28 |
| V. 1. Objetivo general..... | 28 |
| V. 2. Objetivos particulares | 28 |
| VI. MATERIALES Y MÉTODOS | 29 |
| VI. 1. Reactivos | 29 |
| VI. 2. Cepa bacteriana y condiciones de cultivo..... | 29 |
| VI. 3. Purificación de la enzima BADH | 29 |
| VI. 4. Determinación de la actividad de la BADH | 30 |
| VI. 5. Cuantificación de proteína | 31 |
| VI. 6. Modificación química con reactivos específicos para sulfhidrilos..... | 31 |

| | |
|---|-----------|
| A) De monotioles..... | 31 |
| B) De sulfhidrilos vecinales..... | 32 |
| C) Doble modificación de la BADH por reactivos específicos para grupos sulfhidrido | 34 |
| VI. 7. Análisis de los datos..... | 34 |
| VII. RESULTADOS..... | 37 |
| VII. 1. PURIFICACIÓN DE BADH | 37 |
| VII. 2. Modificación química DE LA BADH por reactivos específicos para monotioles..... | 38 |
| VII. 2.1 Modificación por NEM..... | 38 |
| A) Cinética del proceso de inactivación de la BADH por NEM | 38 |
| B) Protección por sustratos de BADH frente a su inactivación por NEM..... | 38 |
| VII. 2.2 Modificación por MMTS | 39 |
| A) Cinética del proceso de inactivación de BADH por MMTS | 41 |
| B) Protección por ligandos de BADH frente a su inactivación por MMTS..... | 44 |
| VII. 3. Modificación química DE LA BADH por reactivos específicos para sulfhidrilos vecinales..... | 49 |
| VII. 3. 1 Modificación por $\text{Cu}(\text{OP})_2$ | 49 |
| A) Cinética del proceso de inactivación de la BADH por $\text{Cu}(\text{OP})_2$ y protección por sus sustratos..... | 49 |
| VII. 3. 2 Modificación por As-BAL | 55 |
| A) Cinética del proceso de inactivación de la BADH por As-BAL..... | 55 |
| B) Protección por los sustratos de la BADH frente a su inactivación por As-BAL..... | 58 |
| VII. 4. Doble modificación de la BADH con reactivos específicos de grupos sulfhidrido..... | 63 |
| VII. 4. 1. Modificación secuencial por NEM y As-BAL | 63 |
| VII. 4. 2. Modificación secuencial por NEM y MMTS..... | 65 |
| VII. 4. 3. Modificación secuencial por oxidación por el oxígeno ambiental y posteriormente por MMTS..... | 67 |
| VIII. DISCUSIÓN | 70 |
| VIII. 1 Modificación de LA BADH por reactivos para monotioles..... | 70 |
| VIII. 2 Modificación de LA BADH por reactivos para ditioles..... | 74 |
| IX. CONCLUSIONES..... | 77 |
| X. PERSPECTIVAS..... | 78 |
| XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 79 |

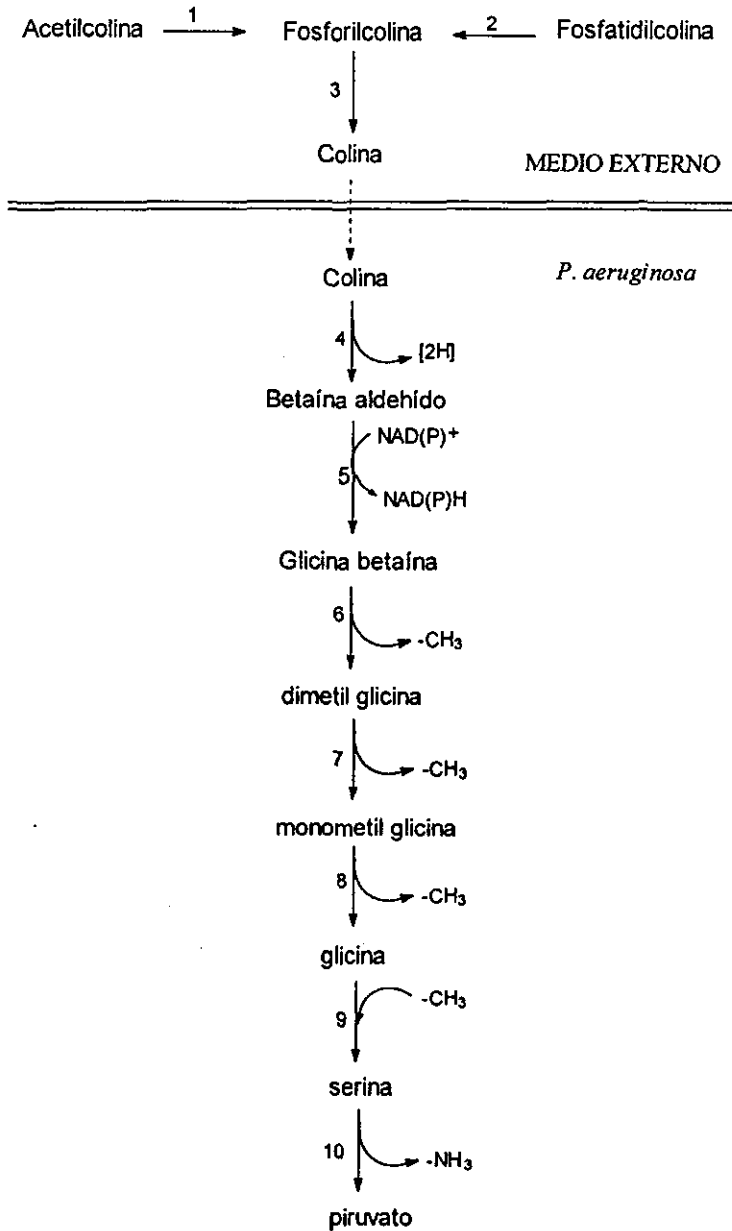
RESUMEN

La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) cataliza el último paso en la síntesis del osmoprotector glicinabetaína. En *Pseudomonas aeruginosa* esta reacción es además un paso obligado en la asimilación de carbono y nitrógeno cuando la bacteria crece en colina o sus precursores. Todas las enzimas aldehído deshidrogenasas estudiadas hasta ahora poseen un residuo de cisteína esencial, el cual está involucrado en la formación de un intermediario tiohemiacetal con el sustrato aldehído y en varias de ellas se ha reportado la presencia de cisteínas vecinales. El presente trabajo tuvo como objetivo investigar el papel que juegan las cisteínas en la actividad de la BADH por medio de modificación química con reactivos específicos de grupo. La enzima se inactivó totalmente al ser incubada en presencia de diferentes reactivos que modifican monotioles y fue reactivada totalmente al agregar un exceso de ditioneitol. Ambos sustratos, NADP⁺ y betaína aldehído, protegen a la enzima frente a la inactivación, lo que sugiere la presencia de al menos un residuo importante de cisteína en el sitio activo. Mientras que NADP⁺ por sí mismo sólo ofrece una protección parcial, betaína aldehído protege totalmente, lo que es consistente con un mecanismo de reacción en el que una cisteína reacciona con el grupo aldehído formando un tiohemiacetal intermediario. La enzima también se inactivó al ser incubada en presencia de reactivos específicos para sulfhidrilos vecinales como cobre-(*o*-fenantrolina)₂ y el complejo arsenito- 2, 3 dimercaptopropanol. En el último caso, la inactivación pudo revertirse completamente por ditioneitol. Los sustratos también protegieron a la enzima frente a la inactivación por estos reactivos. La modificación de la BADH por N-etilmaleimida o por oxidación por el oxígeno del ambiente, bajo condiciones en que la actividad se conserva al 100%, produce una enzima que ya no puede ser inactivada por el complejo arsenito- 2, 3 dimercaptopropanol y que es sólo parcialmente inactivada por el ácido metilmetanotiosulfonato. Considerados en conjunto, nuestros resultados sugieren que existe al menos una cisteína esencial, que forma parte de una pareja de cisteínas vecinales, y que otra cisteína no esencial pudiera estar jugando un importante papel en la protección de la esencial frente a su posible oxidación.

I. INTRODUCCIÓN

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo gram negativo ubicuo que la mayoría de las veces se presenta en el humano como un patógeno oportunista. Las infecciones que provoca se dan comúnmente en personas inmunodeprimidas, pacientes con fibrosis quística, leucémicos y en aquellos que han sufrido quemaduras (Vaca y Cervantes, 1988; Bergen and Shelhamer, 1996; Govan and Deretic, 1996). Esta bacteria invade principalmente el pulmón (Reynolds and Fick, 1980; Pier, 1985), las vías urinarias y el ojo (Geddes, 1980), así como las heridas causadas por quemaduras (Pruitt, 1980).

La glicina betaina, un derivado trimetilado del aminoácido glicina, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y es sintetizado en un gran número de especies de enterobacterias, plantas y animales. Este compuesto ha sido adoptado por una gran variedad de organismos como un osmoprotector muy eficiente (Csonka and Hanson, 1991). En *P. aeruginosa* la glicina betaina se sintetiza a partir de colina o sus precursores mediante la secuencia de reacciones que se muestra en el esquema 1, en donde se observa que la fosfatidilcolina se degrada a fosforilcolina por la acción de la fosfolipasa C (Lisa *et al.*, 1994). Esta enzima extracelular ha sido reconocida como un factor de virulencia determinante en la patogénesis de bacterias como *P. aeruginosa* (Domenech *et al.*, 1991; Shortridge *et al.*, 1992). Por otra parte la acetilcolina es degradada hasta colina por la acción de una colinesterasa y una fosfatasa ácida de fosforilcolina, las cuales son secretadas por la bacteria (Domenech *et al.*, 1991). La colina puede ser convertida a glicina betaina por dos pasos de oxidación: la colina deshidrogenasa es la responsable de la oxidación de colina a betaina aldehído y la betaina aldehído deshidrogenasa (BADH) convierte a la betaina aldehído en glicina betaina (Nagasawa *et al.*, 1975; Nagasawa *et al.*, 1976).



Esquema 1. Síntesis y metabolismo de glicina betaína. Las enzimas que catalizan las reacciones son las siguientes: 1, Acetilcolinesterasa. 2, Fosfolipasa C. 3, Fosfatasa ácida. 4, Colina deshidrogenasa. 5, Betaína aldehído deshidrogenasa. 6, Glicina betaína transmetilasa. 7, Dimetil glicina deshidrogenasa. 8, Monometil glicina deshidrogenasa. 9, Serina transhidroximetilasa. 10, Serina deshidratasa.

Se ha reportado que la presencia de la glicina betaína 200 μM en el medio de crecimiento lleva a que *P. aeruginosa* incremente su tolerancia al estrés osmótico, provocado por altas concentraciones de NaCl (D'Souza-Ault *et al.*, 1993). Por ello, se ha propuesto que la glicina betaína que se acumula en el interior de la bacteria cumple una función "osmoprotectora", ya que este compuesto restaura la presión de turgencia en la membrana celular y protege a las enzimas de una posible inactivación por un incremento de la fuerza iónica (Le Rudulier and Valentine, 1982; Yancey *et al.*, 1982; Somero, 1986; Warr *et al.*, 1988). Igualmente, se ha observado que la inclusión de algunos de los precursores de la colina en el medio de cultivo de la bacteria permite que ésta se adapte a condiciones de hiperosmolaridad (D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Lisa *et al.*, 1994), lo que sugiere que todos ellos son convertidos, bajo estas condiciones, hasta glicina betaína, pues se sabe que la colina no posee propiedades osmoprotectoras *per se* (Styrvold *et al.*, 1986).

P. aeruginosa, como muchas otras bacterias, puede utilizar como fuente de carbono una gran variedad de carbohidratos (Wolff *et al.*, 1991), además de otras sustancias como colina, o precursores de colina, y la glicina betaína (Salvano *et al.*, 1989). La utilización de acetilcolina y colina como única fuente de carbono y nitrógeno lleva a un incremento considerable en la actividad de la enzima que cataliza la última reacción de la síntesis de glicina betaína, la BADH (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 1999).

En las tejidos infectados por *P. aeruginosa* se han encontrado glicina betaína, colina y algún precursor de esta última en concentraciones tales que se les puede considerar como una adecuada fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria. Así, la invasión de la bacteria en el ojo humano parece ser facilitada por la presencia de concentraciones altas de acetilcolina en el epitelio de la córnea (Pepsin and Candia, 1982; Domenech *et al.*, 1991). En el pulmón la fosfatidilcolina constituye aproximadamente un 70% del total del surfactante (Wright and Clemens, 1987). Es muy probable que la actividad de la BADH esté incrementada en *P. aeruginosa* durante su infección en pacientes con fibrosis quística, participando así no sólo en la obtención de nutrientes para la bacteria, sino también en la producción de glicina betaína como sustancia osmoprotectora que le permita sobrevivir en

el ambiente hiperosmótico que se genera por las secreciones viscosas (Deretic *et al.*, 1990) y la alta concentración de Na^+ , Cl^- , Ca^{++} y proteínas atípicas que caracterizan esta enfermedad (Kilbourn, 1978; Seymour, 1984). En las vías urinarias, se ha propuesto que la colina presente en la orina protege a la bacteria del desbalance osmótico generado por el cloruro de sodio y otros electrolitos (Rennick, 1981; Chambers and Kunin, 1987). Podemos pensar que la adaptación de la bacteria a estas condiciones debe involucrar a las enzimas que participan en la síntesis de glicina betaína. De hecho, se ha sugerido que la virulencia de *P. aeruginosa* podría estar relacionada con su capacidad para adaptarse al estrés osmótico (Shortridge *et al.*, 1992).

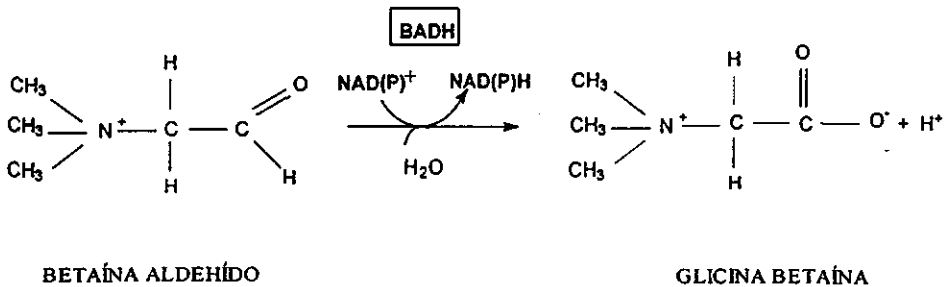
Por otra parte, resulta interesante el hallazgo en estudios recientes de que una mutante de *P. aeruginosa* deficiente en la actividad de BADH no es capaz de crecer ni en colina ni en colina más glicina betaína, debido al efecto tóxico ocasionado por la betaína aldehído, que se acumula en la mutante cuando la colina está presente (Sage *et al.*, 1997). Ello sugiere que una inhibición de la enzima BADH pudiera tener un doble efecto deletéreo sobre la bacteria si está creciendo a expensas de colina o precursores de colina. Por un lado, el crecimiento se detendría al imperdírsele la obtención de carbono, nitrógeno y energía y, por otro, la bacteria acumularía un compuesto sumamente tóxico, la betaína aldehído.

Lo anteriormente expuesto sugiere que la actividad de la BADH puede ser crucial para el crecimiento de la bacteria bajo las condiciones de infección, es decir, bajo estrés osmótico aunado a una abundancia de colina o precursores de colina y, por lo tanto, parece ser un sitio de acción adecuado para agentes antimicrobianos. Sin embargo, el desarrollo de agentes antimicrobianos específicos requiere de un conocimiento lo más completo posible de la enzima. Un requisito importante para la búsqueda o el desarrollo de drogas en un futuro contra *P. aeruginosa*, es la identificación de residuos de aminoácidos esenciales de esta enzima. En este trabajo, como un primer paso para lograr este objetivo, se realizó la modificación química de cisteínas y aportamos evidencia experimental que sugiere que existe una cisteína esencial para la actividad de la BADH, cisteína que forma parte de una pareja y que es protegida de la oxidación por una tercera cisteína de la proteína.

II. ANTECEDENTES

II. 1. BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) cataliza la oxidación irreversible de la betaína aldehído de acuerdo a la siguiente reacción:



Esta enzima está ampliamente distribuida en muy diversos organismos. Ha sido purificada parcialmente a partir de corazón de cangrejo (Dragolovich y Pierce, 1994) y hasta homogeneidad a partir de hígado de humano (Chern and Pietruszko, 1995), de riñón de cerdo (Guzmán-Partida and Valenzuela-Soto, 1998), de hojas de la espinaca (Arakawa *et al.*, 1987; Weretilnyk and Hanson, 1989), de hojas del amaranto (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994), del hongo *Cylindrocarpon didymum* (Mori *et al.*, 1980) y de las bacterias *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1997), *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992), *Escherichia coli* (Falkenberg and Strom, 1990) y *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Russell and Scopes, 1994; Velasco-García *et al.*, 1999).

También se han aislado y secuenciado los genes de BADH de *E. coli* (Boyd *et al.*, 1991), *Sinorhizobium meliloti* (Pocard *et al.*, 1997), de hoja de amaranto (Legaria *et al.*, 1998) y de arroz (Nakamura *et al.*, 1997) y se conoce la secuencia de los cDNA de hoja de espinaca (Weretilnyk and Hanson, 1990), de remolacha (McCue and Hanson, 1992), de

hoja de cebada (Ishitani *et al.*, 1995), de sorgo (Wood *et al.*, 1996), de amaranto (Legaria *et al.*, 1998) y una secuencia parcial de hoja de arroz (Nakamura *et al.*, 1997).

En eucariontes, la BADH puede localizarse en el citosol como es el caso de la enzima de hígado de humano (Chern and Pietruszko, 1995) y de hígado de rata (Wilken *et al.*, 1970), en el cloroplasto, como ocurre en hoja de espinaca (Weretilnyk and Hanson, 1989), o en la mitocondria como es el caso de la enzima de corazón de cangrejo (Dragolovich and Pierce, 1994).

II. 1. 1. Propiedades fisico-químicas

Las propiedades fisico-químicas de las BADHs de plantas, hongos y bacterias se resumen en la Tabla I.

Tabla I. Resumen de las propiedades fisico-químicas de las BADHs de plantas, hongos y bacterias.

| | Fuente biológica | | | | | |
|------------------------------------|--|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|
| | Hoja de amaranto | <i>C. didymum</i> | <i>E. coli</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>X. translucens</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| Propiedad | | | | | | |
| Masa molecular nativa (kDa) | 125 | 220 | 232 | 125 | 200 | 109 |
| Masa molecular por subunidad (kDa) | 63 | 58 | 55 | 54 | 50 | 61 |
| Aminoácidos por subunidad | nd | nd | 511 | nd | 510 | 583 |
| Presencia de nucleótidos unidos | No | nd | No | nd | No | No |
| Referencia | Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994 | Mori <i>et al.</i> , 1980 | Falkenberg and Strom, 1990 | Boch <i>et al.</i> , 1997 | Mori <i>et al.</i> , 1992 | Velasco-García <i>et al.</i> , 1999 |

nd: no determinado

II. 1. 2. Estructura

La BADH puede presentar diferentes estados de agregación: las enzimas de hígado de humano (Chern and Pietruszko, 1995), de hígado de salmón (Johansson *et al.*, 1998), de *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980), de *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992) y de *E. coli* (Falkenberg and Strom, 1990) son tetraméricas. Las enzimas de hoja de espinaca (Pan *et al.*, 1981; Arakawa *et al.*, 1987; Weretilnyk and Hanson, 1989), de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994), de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1997) y de *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 1999) son diméricas.

A la fecha se conocen las estructuras tridimensionales de muy pocas aldehído deshidrogenasas: la aldehído deshidrogenasa 2 de bovino (ALDH2), enzima dimérica (Steinmetz *et al.*, 1997), la aldehído deshidrogenasa 3 de rata (ALDH3), enzima tetramérica (Liu *et al.*, 1997) y la BADH de hígado de salmón, enzima tetramérica (Johansson *et al.*, 1998). Esta última tiene tres dominios distintos en cada subunidad: un dominio de unión a la coenzima, un dominio catalítico y un dominio de oligomerización. También se determinó que el nucleófilo del sitio activo es Cys297, localizada en el fondo de un túnel que va desde la superficie de la molécula hacia este residuo (Johansson *et al.*, 1998).

II. 1. 4. Propiedades cinéticas

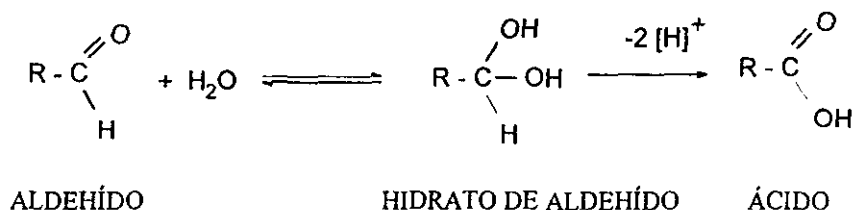
A) Especificidad de sustratos

Todas las BADHs estudiadas presentan una cinética de Michaelis Menten y la reacción es irreversible. Estas enzimas de diferentes orígenes pueden utilizar NAD^+ y NADP^+ como coenzimas, aunque existen diferencias entre ellas en la preferencia por el la coenzima. La mayoría de las enzimas estudiadas utilizan preferentemente al NAD^+ , como la de humano (Chern and Pietruszko, 1995), de cangrejo (Dragolovich and Pierce, 1994), de *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980), de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996), de *E. coli* (Falkenberg and Strom, 1990), de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994) y de

espinaca (Weretilnyk and Hanson, 1989). Otras BADHs usan preferentemente al NADP⁺, tal es el caso de las enzimas de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 1999) y de *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992). Por otra parte, la BADH de riñón de cerdo (Guzmán-Partida and Valenzuela-Soto, 1998) y la de *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980) utilizan únicamente NAD⁺ como coenzima.

Hasta hace poco tiempo, las BADHs habían sido consideradas como enzimas altamente específicas para la betaína aldehído. Sin embargo, Chern and Pietruszko (1995) encontraron que otros aldehídos con carga positiva como γ -aminobutiraldehído eran buenos sustratos de la BADH de hígado de humano. Esta observación fue confirmada en amaranto (Vojtechová *et al.*, 1997b) y en plantas de tabaco transgénicas (Trossat *et al.*, 1997), comprobándose además que otros aldehídos con carga positiva, el 3-dimetilsulfoniopropionaldehído es también sustrato de la reacción (Vojtechová *et al.*, 1997b; Trossat *et al.*, 1997). Sin embargo, la BADH de *P. aeruginosa* muestra un alto grado de especificidad en el sitio de unión de la betaína aldehído (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 1999). Esta enzima no puede catalizar la oxidación de otros aldehídos, incluyendo aquellos con carga positiva (Velasco-García *et al.*, 1999).

Los aldehídos en solución acuosa se encuentran en equilibrio con sus hidratos, cuya deshidrogenación puede producir un ácido (Metzler, 1997), como se muestra en el siguiente esquema:



Sin embargo, las aldehído deshidrogenasas descritas no utilizan como sustrato al hidrato de aldehído, con la posible excepción de la histidinol deshidrogenasa (Teng *et al.*, 1993). Aún se desconoce cuál es el verdadero sustrato de la BADH, aunque se supone por analogía con las otras aldehído deshidrogenasas que es la forma aldehído.

B) Mecanismo cinético

La mayoría de las aldehído deshidrogenasas presentan un mecanismo secuencial ordenado en el que el nucleótido se une a la enzima antes que el aldehído (Ryzewski and Pietruszko, 1980; Rivett and Tipton, 1981). En el caso de la BADH el mecanismo cinético ha sido estudiado en la enzima de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1993; Vojtechová *et al.*, 1997 a/b) y en las de *E. coli* (Falkenberg and Strom, 1990), *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992) y *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 1999; Velasco-García *et al.*, 1999b manuscrito sometido). La BADH de hoja de amaranto sigue un mecanismo cinético secuencial de tipo Iso Bi Bi ordenado en estado estacionario a bajas concentraciones de sustratos, siendo NAD^+ el primer sustrato que se une a la enzima y NADH el último producto que se libera (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1993). La betaína aldehído a concentraciones mayores de 500 μM se comporta como un inhibidor no competitivo frente a NAD^+ y eventualmente a concentraciones muy altas, el mecanismo cinético puede cambiar a un aparente Ping Pong (Vojtechová *et al.*, 1997a). Únicamente un producto, NADH, produce inhibición, ya que el otro producto de la reacción, glicina betaína, no inhibe a la enzima aún a altas concentraciones.

En las Tablas II y III se resumen algunas de las propiedades cinéticas de las BADHs de mamíferos, hongos, plantas y bacterias estudiadas hasta la fecha.

Tabla II. Resumen de propiedades cinéticas de las BADHs de mamíferos, hongos y plantas estudiadas hasta la fecha.

| Coenzima | Fuente biológica | | | |
|--|----------------------------|---------------------------|--|-----------------------------|
| | hígado de humano | <i>C. didymum</i> | hoja de amaranto | hoja de espinaca |
| | NAD ⁺ | NAD ⁺ | NAD ⁺ | NAD ⁺ |
| V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$) | 6-7 | | 1.97 | |
| K_m nucleótido (μM) | 8 | 380 | 39.5 | 20 |
| K_m betaina líquido (μM) | 260 | 310 | 56.1 | |
| pH del estudio | 7.4 | 8.0 | 8.0 | 8.0 |
| Inhibición por BA | nd | nd | + | nd |
| Inhibición por NAD ⁺ | nd | nd | + | nd |
| Mecanismo cinético | nd | Ping-Pong | Iso Bi Bi ordenado en estado estacionario | nd |
| Referencia | Chern and Pietruszko, 1995 | Mori <i>et al.</i> , 1980 | Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1993; Vojtechova <i>et al.</i> , 1997a. Muñoz-Clares <i>et al.</i> , 1997. | Weretilnyk and Hanson, 1989 |

nd: no determinado.

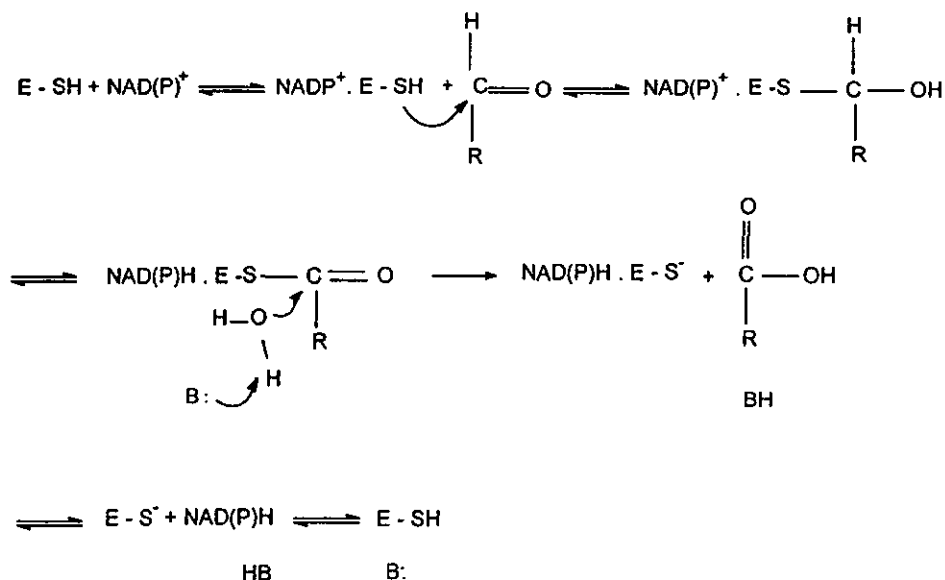
Tabla III. Resumen de propiedades cinéticas de las BADHs de bacterias estudiadas hasta la fecha.

| Coenzima | Fuente biológica | | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|---|-------------------|
| | <i>E. coli</i> | | <i>X. translucens</i> | | <i>P. aeruginosa</i> | |
| | NAD ⁺ | NADP ⁺ | NAD ⁺ | NADP ⁺ | NAD ⁺ | NADP ⁺ |
| V_{max} ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg prot}^{-1}$) | 66 | 30 | 179 | 133 | 133 | 121 |
| K_m nucleótido (μM) | 99 | 400 | 70 | 50 | 229 | 62 |
| K_m betaina aldehído (μM) | 160 | nd | 190 | nd | 438 | 453 |
| pH del estudio | 7.5 | 7.5 | 9.0 | 9.0 | 7.5 | 7.5 |
| Inhibición por BA | + | nd | + | nd | - | + |
| Inhibición por nucleótido | - | + | nd | nd | + | + |
| Mecanismo cinético | Ping Pong | | nd | | Al azar | |
| Referencia | Falkenberg and Strom, 1990 | | Mori <i>et al.</i> , 1992 | | Velasco-García <i>et al.</i> , 1999 a/b. | |

nd: no determinado.

II. 1. 4. Mecanismo de reacción

Todas las aldehído deshidrogenasas estudiadas poseen un residuo de cisteína esencial. El mecanismo de reacción propuesto involucra a esta cisteína que realiza un ataque nucleofílico al grupo carbonilo del aldehído formando como intermediario covalente un tiohemiacetal (Hempel *et al.*, 1982, 1991, 1993; Von Bahr-Lindström *et al.*, 1985; Tu and Weiner, 1988 a/b; Kitson *et al.*, 1991; Blatter *et al.*, 1992; Wang and Weiner, 1995; Farrés *et al.*, 1995). Posteriormente, la reducción de la coenzima conlleva la formación de un tioéster. Por otra parte, una base general realiza la desprotonación de una molécula de agua, la cual ataca al tioéster para producir el ácido, como se muestra en el Esquema 2. El paso irreversible de la reacción puede ser la liberación del ácido o la hidrólisis del tioéster. Para la BADH se ha propuesto el mismo mecanismo de reacción (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1993), pero aún no está demostrado.



Esquema 2. Mecanismo de reacción de aldehído deshidrogenasas.

Sin embargo, podrían existir mecanismos alternos, como lo muestra el hallazgo, en estudios realizados con la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa de *E. coli*, de que una mutación del residuo nucleofílico del sitio activo, Cys149 a alanina, produce una enzima que usa al hidrato de aldehído como su verdadero sustrato, en lugar de la forma aldehído (Corbier *et al.*, 1992). Además, estudios de mutagénesis realizados en los residuos de cisteína conservados de la enzima histidinol deshidrogenasa han indicado que esta enzima no utiliza una cisteína para formar el intermediario tiohemiacetal catalítico, sino que presenta un nuevo mecanismo de oxidación que podría basarse en el uso del hidrato de aldehído como sustrato (Teng *et al.*, 1993).

En las BADHs no se ha determinado el paso limitante de la velocidad de reacción, aunque estudios recientes en la enzima de *P. aeruginosa* demostraron que el paso limitante es la transferencia del hidruro del aldehído a la coenzima (Velasco-García *et al.*, 1999b, sometido).

II. 1. 5. Aminoácidos esenciales

Se ha observado que existen 15 residuos estrictamente conservados en las aldehído deshidrogenasas, muchos de los cuales están agrupados alrededor del sitio activo. Estos residuos son: ocho glicinas, dos prolinas, una lisina, una fenilalanina, una asparragina, un glutámico y una cisteína (Johansson *et al.*, 1998).

Existen numerosas evidencias que indican que la cisteína es el residuo que realiza el ataque nucleofílico al grupo carbonilo del aldehído (Weiner *et al.*, 1995). En estudios con la aldehído deshidrogenasa citoplasmática de hígado de oveja se logró identificar a la Cys302 como el probable residuo nucleofílico esencial catalítico (Kitson *et al.*, 1991). En la aldehído deshidrogenasa mitocondrial de hígado de rata se ha sugerido que la Cys302 es el nucleófilo del sitio activo, ya que la mutación de la Cys302 a alanina causa que la enzima mutada sea catalíticamente inactiva (Farrés *et al.*, 1995). En la aldehído deshidrogenasa de *Vibrio harveyi* se ha determinado que la Cys289 está involucrada en la actividad catalítica,

ya que la mutación de esta cisteína a serina disminuye su actividad hasta en cinco órdenes de magnitud (Vedadi *et al.*, 1995).

Además, se requiere de otra base que realice la desprotonación del agua para que ésta pueda realizar la hidrólisis y libere el ácido. Los residuos que podrían llevar a cabo esta función son la histidina y el glutámico. Aunque existen residuos de histidina conservados entre las aldehído deshidrogenasas de mamífero, ninguna está conservada entre los demás organismos. Análisis por mutagénesis sitio-dirigida han revelado que ninguno de los residuos de histidina son esenciales para la actividad de la aldehído deshidrogenasa de hígado de rata, ya que la mutación de las histidinas a alaninas sólo causan la pérdida de la actividad catalítica cuando mucho en un 50%. Por lo que no existe alguna evidencia directa que sugiera que la histidina tenga el papel de base general (Zheng and Weiner, 1993). Por otra parte, trabajos realizados en la aldehído deshidrogenasa mitocondrial de humano han sugerido que el Glu268 podría funcionar como la base general necesaria (Abriola *et al.*, 1990) ya que su mutación a glutamina causó una pérdida dramática en la actividad catalítica (Wang and Weiner, 1995). Esto parece ser cierto también en el caso de las BADH, ya que estudios de cristalografía de rayos X de la BADH de hígado de salmón han determinado que existe un residuo de glutámico, el Glu263 que podría ser la base, ya que se encuentra en el sitio activo a una distancia de 6.2 Å de la cisteína esencial (Johansson *et al.*, 1998).

II. 1. 6. Función biológica

En los mamíferos, se ha postulado que la BADH está involucrada en el metabolismo de los aminoaldehídos (Kurys *et al.*, 1989), de las poliaminas (Ambroziak and Pietruszko, 1991) y de la putrescina al ácido γ -aminobutírico, el cual es el principal neurotransmisor en el sistema nervioso central (Chern and Pietruszko, 1995; Pietruszko *et al.*, 1997). Por otra parte, también juega un papel muy importante en la producción de glicina betaína (Petronini *et al.*, 1992), que puede servir como donador de metilos en la biosíntesis de metionina y como fuente de nitrógeno (Du Vigneaud *et al.*, 1946) o como un *osmoprotector en células* de mamífero (Petronini *et al.*, 1992; Biggers *et al.*, 1993).

En plantas superiores, la BADH juega un papel muy importante en la acumulación de glicina betaina bajo condiciones de estrés osmótico (Wyn Jones and Storey, 1981; Gamboa *et al.*, 1991; Rhodes and Hanson, 1993). La glicina betaina, ha sido el principal compuesto de amonio cuaternario estudiado recientemente, en el caso de plantas se ha comprobado que este compuesto facilita la adaptación a ambientes salinos o secos. Además, puede representar más del 20% del nitrógeno total en algunas plantas jóvenes saludables en el campo (Storey and Win Jones, 1977). Recientemente, se ha sugerido que en plantas la BADH también está involucrada en la biosíntesis del osmoprotector dimetilsulfoniopropionato (Trossat *et al.*, 1996; Vojtechova *et al.*, 1997b) y en el metabolismo de poliaminas (Trossat *et al.*, 1997).

En bacterias, la BADH es importante en la síntesis y acumulación del osmoprotector glicina betaina bajo estrés osmótico (Imhoff and Rodríguez-Valera, 1984; Le Rudulier and Bouillard, 1983; Yancey *et al.*, 1982; Bernard *et al.*, 1986; Landfald and Strom, 1986; Smith *et al.*, 1988). En microorganismos como *R. meliloti*, *X. translucens* y *P. aeruginosa* esta enzima participa además en el catabolismo de colina (Nagasawa *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1988; Mori *et al.*, 1992).

II. 1. 7. Regulación de la expresión génica y de la actividad de BADH

La BADH no es una enzima alostérica y no se conocen metabolitos reguladores de su actividad, aparte de sus sustratos y de las coenzimas reducidos que son sus productos. Su actividad es por tanto regulada principalmente a través de la modulación de la expresión génica.

En las diversas plantas donde se ha caracterizado el gen o el cDNA de la BADH se ha observado una expresión basal del transcrito que se induce bajo condiciones de estrés osmótico. Por ejemplo, los niveles de ARNm (Weretilnyk and Hanson, 1990; McCue and Hanson, 1992) y de actividad de la BADH se incrementan en hojas de espinaca sometidas a estrés por 200 mM de NaCl (Weretilnyk and Hanson, 1989), mientras que en hojas y raíces

de plantas de remolacha sometidas al mismo estrés aumentan 3 y 4 veces, respectivamente (McCue and Hanson, 1992; Weretilnyk and Hanson, 1990). Los niveles de ARNm de la BADH en cebada se elevan 8 veces por efecto de estrés salino (300 mM de NaCl durante 48 horas) y el gen se regula a nivel transcripcional por estrés hídrico (PEG al 20% (p/v) durante 48 horas) y al ácido abscísico (ABA) 100 μ M durante 96 horas (Ishitani *et al.*, 1995). La BADH en sorgo se regula a nivel transcripcional por efecto de estrés hídrico, observándose un incremento de 2 a 3 veces en los niveles de ARNm después de someter a las plantas a 23 días de sequía (Wood *et al.*, 1996). En hojas de amaranto se observó que la actividad de la BADH aumenta en respuesta a un estrés hiperosmótico (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994). Por otra parte, también la proteína y el ARNm para la BADH está presente en hojas de plantas bajo condiciones normales y sus niveles se incrementan de manera rápida después de la exposición al ABA y a estrés osmótico (PEG 17.5% (p/v), o NaCl 0.5 M) (Legaria *et al.*, 1998).

En *E. coli*, la biosíntesis de glicina betaína está controlada por los genes *betTIBA*. *betA* y *betB* que codifican para la colina deshidrogenasa y para la BADH, respectivamente (Lamark *et al.*, 1991). La expresión de los genes *bet* está controlada por la fuerza osmótica del ambiente y en forma menos importante por la disponibilidad de colina (Landfald and Strom, 1986; Styrvoid *et al.*, 1986; Eshoo, 1988). El producto de la reacción la glicina betaína actúa únicamente como una sustancia osmoprotectora, ya que no puede ser metabolizada por *E. coli* (Le Rudulier *et al.*, 1984; Landfald and Strom, 1986).

En contraste con *E. coli*, *R. meliloti*, *X. translucens* y *P. aeruginosa* pueden utilizar tanto colina como glicina betaína como fuente de carbono, nitrógeno y energía. En estas bacterias se han observado niveles basales de la actividad de BADH que se incrementan bajo condiciones de estrés osmótico o presencia de colina. La presencia de ésta o sus precursores estimula su rápida oxidación a glicina betaína y la degradación subsecuente de glicina betaína a través de una serie de desmetilaciones (Bernard *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1988). Por otra parte, un incremento en la presión osmótica en el medio reduce el catabolismo de glicina betaína y favorece su acumulación (Nagasawa *et al.*, 1976; Bernard

et al., 1986; Smith *et al.*, 1988). En algunas cepas de *R. meliloti* la glicina betaína (1 mM) promueve su crecimiento aún con niveles altos de sal (Bernard *et al.*, 1986).

II. 2. MODIFICACIÓN QUÍMICA

La modificación química es uno de los métodos más usados para identificar a los grupos funcionales de una proteína. Ésta requiere únicamente de reacciones químicas que sean específicas para cada tipo de aminoácido. Se han descrito métodos de modificación química de las cadenas laterales de algunos aminoácidos como el ácido aspártico, el ácido glutámico, la histidina, la lisina, la arginina, la metionina, el triptófano, la tirosina y la cisteína.

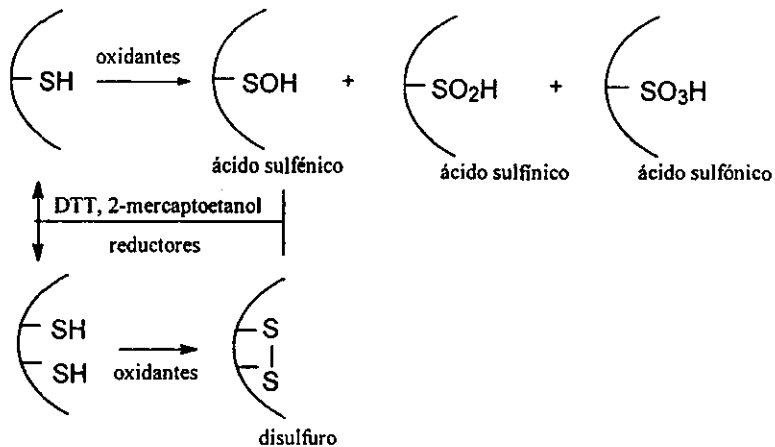
Los residuos de aminoácidos que participan en la actividad son usualmente accesibles al solvente lo que facilita su modificación. Cuando ésta se lleva a cabo en la presencia y en la ausencia de ligandos es un buen método para identificar a los residuos del sitio activo. Además, de este modo se puede medir la constante de disociación de los complejos de los ligandos con la enzima y detectar cambios conformacionales inducidos por éstos. También se puede llegar a obtener los valores de pK_a de los residuos estudiados y conocer el efecto de los ligandos sobre su estado de ionización. Además, en el caso concreto de las cisteínas, la técnica de modificación química nos permite conocer la existencia de residuos de cisteínas vecinales. Por todo lo mencionado anteriormente, el uso de la modificación química nos ayuda a conocer algunas características del ambiente que rodea al sitio activo.

La mutagénesis sitio-dirigida tiene la ventaja de alterar la estructura de la proteína de una forma mucho más específica que la modificación química, debido a que se cambian únicamente ciertos aminoácidos sin introducir grupos extraños a la proteína. Sin embargo, en muchas ocasiones ambas técnicas son complementarias (Imoto and Yamada, 1989).

II. 2. 1. Modificación química de cisteínas

Los grupos tioles de los residuos de cisteína de las proteínas pueden ser modificados por diferentes procedimientos. Dado que el grupo tiol es el nucleófilo más fuerte de los grupos funcionales de los aminoácidos, la especificidad de muchos reactivos para los grupos tioles es generalmente alta.

Existen cuatro estados de oxidación de las cisteínas que pueden ser: puente disulfuro, ácido sulfénico (SOH), ácido sulfinico (SO₂H) y el ácido sulfónico o ácido cisteico (SO₃H), como se muestran en el siguiente esquema:



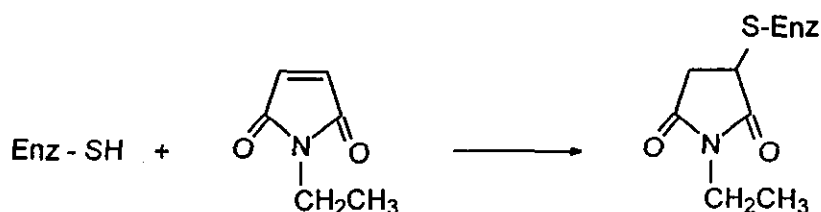
El ácido sulfénico y el disulfuro pueden ser reducidos a cisteína libre al agregar reactivos como el DTT o el β -mercaptoetanol (Skorey *et al.*, 1997).

A) Reactivos específicos para monotioles

Los grupos sulfhidrilo de las enzimas poseen un alto grado de reactividad y esta propiedad ha permitido su modificación química a través de diferentes reactivos específicos y altamente selectivos que reaccionan rápidamente. El número de estos reactivos es muy

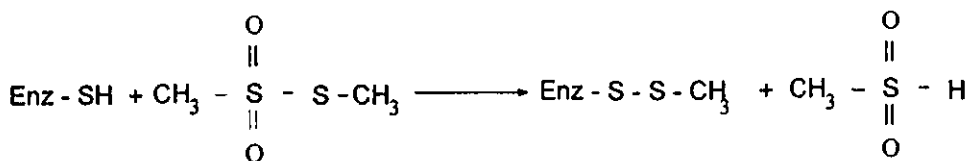
grande, pero me referiré en forma específica sólo a dos NEM y MMTS, que son los usados en este trabajo.

El NEM es un reactivo muy empleado, particularmente porque su producto de reacción es muy estable aún a la hidrólisis ácida. Las características importantes de este reactivo son la formación de un derivado alquílico estable, así como la introducción en forma irreversible de un grupo muy voluminoso en la proteína (Riordan and Vallee, 1972; Imoto and Yamada, 1989).



Esquema de reacción del NEM con residuos de cisteína (Imoto and Yamada, 1989).

El MMTS es un reactivo que actúa rápidamente y específicamente con grupos monotioles introduciendo un grupo pequeño (-SCH₃) dentro de la proteína. Su efecto puede ser revertido por DTT o β-mercaptoetanol (Smith *et al.*, 1975).

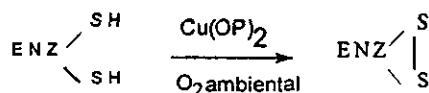


Esquema de reacción del MMTS con residuos de cisteína (Smith *et al.*, 1975).

B) Reactivos específicos para sulfhidrilos vecinales

Al igual que en el caso de los reactivos específicos para monotioles, existe un gran número de reactivos para sulfhidrilos vecinales, pero me referiré en forma específica sólo a dos, al complejo Cu(OP)_2 y al As-BAL, que son los usados en este trabajo.

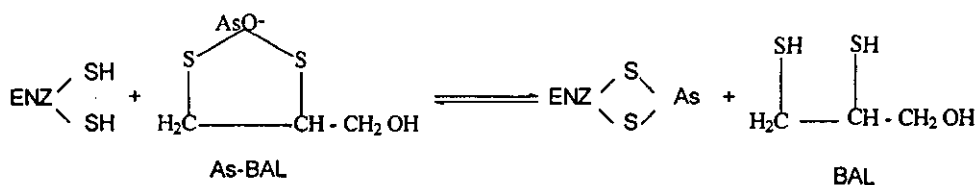
El complejo Cu(OP)_2 cataliza la oxidación por oxígeno molecular de grupos sulfhidrido a disulfuros (Kobashi, 1968).



Esquema de reacción del Cu(OP)_2 con un par cisteínas vecinales (Kobashi, 1968).

Por otra parte, el arsenito forma derivados ditioarsenicales cíclicos con compuestos que posean grupos tioles vecinales, como el BAL o el DTT. Debido a su estabilización por la formación de un anillo, estos derivados poseen constantes de estabilidad mucho mayores que los derivados monoarsenicales que pueden formarse con compuestos que poseen sólo un tiol (Stocken, 1947).

En el caso del As-BAL, se ha propuesto un modelo para su mecanismo de acción que postula que el complejo As-BAL neutraliza la carga del arsenito permitiendo así que éste tenga acceso a sitios muy hidrofóbicos, como pueden ser sitios activos de las enzimas (Fluharty and Sanadi, 1961). Una vez allí, si encuentra una pareja de sulfhidrilos vecinales en la geometría adecuada para formar un complejo ditioarsenito más estable que el formado con el BAL, el arsenito es cedido por el As-BAL a la enzima, según el siguiente esquema:



Esquema de reacción del As-BAL con un par de cisteínas vecinales (Fluharty and Sanadi, 1961).

II. 2. 2. Modificación química de cisteínas de aldehído deshidrogenasas

Debido a la importancia que tienen las cisteínas en las aldehído deshidrogenasas se han realizado diferentes trabajos utilizando modificación química de estos residuos en las enzimas de hígado humano (Hempel and Pietruszko, 1981; Hempel *et al.*, 1982), de hígado de caballo (Tu and Weiner, 1988 a/b), de hígado de oveja (Hill *et al.*, 1994), del alga verde *Clamydomonas reinhardtii* (Iglesias *et al.*, 1987) y de hoja de espinaca (Iglesias and Losada, 1988). Estudios similares se han realizados con las BADHs de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976), de *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980), de *E. coli* (Falkenberg and Strom, 1990), de *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992) y de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994).

Experimentos de modificación química en la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa no fosforilante de *C. reinhardtii* han sugerido la presencia de cisteínas vecinales esenciales debido a la inactivación total de la enzima producida por diamida (Iglesias *et al.*, 1987). También se ha comprobado la existencia de cisteínas esenciales en la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa de hojas de espinaca mediante la modificación por iodoacetamida y diamida, las cuales produjeron una inactivación completa de la enzima (Iglesias and Losada, 1988)

Trabajos realizados con la BADH de *P. aeruginosa* mostraron que después de una preincubación por 3 min a 30°C con diferentes reactivos para sulfhidrilos como el *p*-(cloromercuri)benzoato (10 µM), el ácido iodoacético (1mM) y el acetato de mercurio (1 mM) se produjo una pérdida apreciable de la actividad de la enzima, lo que sugiere la existencia de cisteínas esenciales en esta enzima (Nagasawa *et al.*, 1976).

Por otra parte, existe una serie de fármacos que actúan por modificación irreversible de las cisteínas de las aldehído deshidrogenasas. Entre ellos se encuentra el disulfiram que es empleado terapéuticamente en el tratamiento del alcoholismo (Hald *et al.*, 1948; Graham, 1951). Este fármaco inhibe a las aldehído deshidrogenasas por la formación de puentes disulfuro mixtos con grupos sulfhidrilos esenciales en la proteína (Vallari and Pietruszko, 1982). Diversos metabolitos del disulfiram, como el *S*-metil *N*, *N*-dietilditiocarbamato (MeDTC) sulfóxido y la sulfona inactivan a la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (MacKerell *et al.*, 1985; Mays *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 1997) y/o citosólica de hígado de humano (Lam *et al.*, 1997).

Otro fármaco empleado es el dinitrato de isosorbide. Este compuesto es usado clínicamente como un relajante del músculo liso en el tratamiento de angina de pecho y en el tratamiento del alcoholismo, al igual que el disulfiram. La relajación del músculo en la presencia de isosorbide es dependiente de la presencia de grupos sulfhidrilos en el tejido. En trabajos realizados con la aldehído deshidrogenasa de hígado de humano se ha comprobado que el dinitrato de isosorbide produce una inactivación de sus isoenzimas E_1 y E_2 , eliminando tanto la actividad de esterasa como la de deshidrogenasa (Mukerjee and Pietruszko, 1994).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la BADH de *P. aeruginosa* no se conocen aún los aminoácidos que forman el sitio activo y que son esenciales para la actividad de esta enzima, a pesar del interés que tiene para la búsqueda o diseño de inhibidores específicos.

En estudios previos en nuestro laboratorio, hemos caracterizado a la enzima BADH de *P. aeruginosa*, la cual es un homodímero con cuatro cisteínas por subunidad (Velasco-García *et al.*, 1999), aunque aún no conocemos si alguna(s) de ellas participa(n) en la catálisis y/o estabilidad de esta enzima.

IV. HIPÓTESIS

La enzima BADH de *Pseudomonas aeruginosa* podría ser modificada por reactivos específicos para monotioles y para grupos sulfhidrilos vecinales.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la BADH de *P. aeruginosa* no se conocen aún los aminoácidos que forman el sitio activo y que son esenciales para la actividad de esta enzima, a pesar del interés que tiene para la búsqueda o diseño de inhibidores específicos.

En estudios previos en nuestro laboratorio, hemos caracterizado a la enzima BADH de *P. aeruginosa*, la cual es un homodímero con cuatro cisteínas por subunidad (Velasco-García *et al.*, 1999), aunque aún no conocemos si alguna(s) de ellas participa(n) en la catálisis y/o estabilidad de esta enzima.

IV. HIPÓTESIS

La enzima BADH de *Pseudomonas aeruginosa* podría ser modificada por reactivos específicos para monotoles y para grupos sulfhidrilos vecinales.

V. OBJETIVOS

V. 1. OBJETIVO GENERAL

Investigar el papel que juegan las cisteínas en la actividad de la BADH de *P. aeruginosa* por medio de la modificación química con reactivos específicos de grupo.

V. 2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cultivar *P. aeruginosa* bajo condiciones ya establecidas en nuestro laboratorio que permiten la inducción de la enzima BADH y purificar esta proteína a homogeneidad.
2. Investigar por medio de modificación química con reactivos específicos para monotioles, la existencia de residuos de cisteína que sean esenciales para la actividad de BADH. Para ello:
 - a) Estudiar la cinética de inactivación.
 - b) Determinar el grado de protección que ofrezcan los ligandos del sitio activo frente a la inactivación por estos reactivos.
3. Investigar la presencia de grupos sulfhidrilos vecinales esenciales por medio de la modificación química con reactivos específicos para ditioles. Para ello:
 - a) Estudiar la cinética de inactivación.
 - b) Determinar el grado de protección que ofrezcan los ligandos del sitio activo frente a la inactivación por estos reactivos.
4. En caso de encontrar sulfhidrilos esenciales de los dos tipos, investigar si son los mismos. Para ello realizar experimentos de doble modificación, incubando a la enzima en forma secuencial con un reactivo para monotioles seguido de otro para ditioles.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI. 1. REACTIVOS

Betaina aldehído, NAD^+ , NADH , NADP^+ , NADPH , DTT, β -mercaptoetanol, DTT, arsenito de sodio (As), BAL, $\text{Cu}(\text{OP})_2$, DTNB, MMTS, NEM y SDS fueron adquiridos de Sigma (St. Louis, MO, U. S. A.); EDTA y glicerol de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania) y los materiales para las columnas de cromatografía de Pharmacia (Uppsala, Suecia).

VI. 2. CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se trabajó con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, donada generosamente por el Dr. M. L. Vasil (University of Colorado, Health Sciences Center, U.S.A.). Las bacterias fueron crecidas aeróbicamente a 37°C en medio líquido. El medio de cultivo que se utilizó como base fue medio mínimo M63 (Miller, 1977), conteniendo glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, y modificado en sus niveles de fosfato (39 mM en lugar de 100 mM). El inóculo de las bacterias se hizo en 30 mL de medio M63 y se dejó que crecieran en condiciones óptimas, hasta su fase exponencial. Posteriormente las bacterias fueron transferidas a cultivos de 4.8 L, en los cuales se sustituyó la glucosa y el amonio por colina en una concentración final de 20 mM, con el fin de inducir a la enzima BADH. Las bacterias fueron crecidas en un agitador giratorio (150 rpm) a 37°C hasta la fase estacionaria. El cultivo de bacterias fue cosechado por centrifugación a 3,000 X g por 20 min y resuspendidos en 240 mL de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6.5, conteniendo 0.1 mM EDTA y 20 mM de β -mercaptoetanol.

VI. 3. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA BADH

Las bacterias resuspendidas fueron desintegradas por oscilación sónica (90 s a 60 W) en un sonicador Branson (Danbury, CT, U.S.A.) y posteriormente centrifugadas a

14,500 X g durante 30 min. Con el sobrenadante obtenido después de centrifugar se procedió a la rápida purificación de la enzima por métodos ya establecidos (Velasco-García *et al.*, 1999). Brevemente, la purificación se realiza sometiendo el extracto libre de células a una cromatografía de intercambio iónico usando sefarosa de flujo rápido (Q-Fast Sepharose, Pharmacia, Uppsala, Sweden) y posteriormente las fracciones con actividad de BADH se someten a una cromatografía de afinidad usando 2'5'ADP-sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Todos estos pasos fueron realizados a una temperatura de 4°C. Las fracciones con actividad son colectadas y almacenadas a -20°C en alícuotas en un amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 6.9, conteniendo 20% de glucosa (p/v), 0.1 mM EDTA y 25 mM KCl.

La pureza de la enzima se verificó a través de electroforesis en gel. El análisis electroforético se llevó a cabo en geles de acrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) utilizando un gel separador al 8% (p/v) y un gel concentrador al 4% (p/v) de acuerdo a Laemmli (1970). Se usó una cámara de electroforesis MiniProtean II (BioRad, Hercules, California). Los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie (R-250).

VI. 4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA BADH

La actividad de la betaína aldehído deshidrogenasa se midió por espectrofotometría, registrando la formación de la coenzima reducida (NAD(P)H) a 340 nm con un espectrofotómetro PU 8710 (Philips, Cambridge, U.K.) equipado con un programa cinético. Los ensayos de actividad se llevaron a cabo a 30°C en un volumen final de 0.5 mL. El medio de reacción estándar consistió de 1.0 mM de betaína aldehído (suma de las especies libres e hidratadas) y 0.5 mM de NADP⁺ en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5. Los ensayos fueron iniciados por la adición de la enzima. La concentración de enzima usada fue del intervalo de 0.36-3 µg de proteína por 0.5 mL de la mezcla de reacción.

VI. 5. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA

Las concentraciones de proteína se determinaron por el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica de bovino como patrón de proteína.

VI. 6. MODIFICACIÓN QUÍMICA CON REACTIVOS ESPECÍFICOS PARA SULFHIDRILOS

Previamente a la modificación, y con el propósito de eliminar el β -mercaptoetanol, una alícuota de enzima pura (170-300 $\mu\text{g/mL}$) se sometió a una columna de Sephadex G-25, equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5, conteniendo glicerol 20% (v/v) y KCl 25 mM siguiendo el método de Penefsky (1977).

A) De monotoles

La enzima en este amortiguador se incubó con reactivos específicos de grupos sulfhidrilos, tales como ácido metilmetanotiosulfonato (MMTS) y la N-etilmaleimida (NEM) a 30°C. La enzima previa a la modificación fue mantenida en un tubo conectado a una bomba de vacío por 2 min y tratada posteriormente con nitrógeno gaseoso. La modificación fue iniciada por la adición de los reactivos indicados anteriormente. Las incubaciones se realizaron en tubos cerrados y a diferentes intervalos de tiempo se tomaron alícuotas de 5 μL y se determinó en ellas la actividad enzimática remanente. La dilución de la alícuota en la cubeta de reacción (100 veces) evita que continúe la inactivación. Se determinó la dependencia de los efectos observados con respecto al tiempo y a la concentración del reactivo.

Para los estudios de protección por ligandos, la enzima en el amortiguador de incubación fue preincubada por 2 min a 30°C con diferentes ligandos a las concentraciones indicadas en Resultados y posteriormente se agregó el reactivo específico de grupo sulfhidrilo (NEM o MMTS). Se tomaron alícuotas de 5 μL a diferentes tiempos de

incubación y se determinó en ellas la actividad enzimática remanente. El estudio de protección de BADH por betaína aldehído frente a la inactivación por MMTS se llevó a cabo en un amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 8.0.

La reversión de la modificación química por MMTS se llevó a cabo utilizando DTT. A la enzima inactivada completamente se le agregó DTT 20 mM y a diferentes intervalos de tiempo se tomaron alícuotas, las cuales fueron usadas inmediatamente para la determinación de la actividad enzimática.

B) De sulfhidrilos vecinales

La enzima se incubó con reactivos específicos de grupos sulfhidrilos vecinales como el complejo Cu(II) o-fenantrolina (Cu(OP)_2) o el complejo del arsenito de sodio con el BAL (As-BAL).

La solución de Cu(OP)_2 se preparó inmediatamente antes de su uso mezclando volúmenes iguales de CuSO_4 4 mM y 1, 10-fenantrolina 8 mM, ambos disueltos en agua destilada (Modrak *et al.*, 1988).

La solución de As-BAL fue preparada también inmediatamente antes de su uso mezclando soluciones equimolares de As y de BAL en agua destilada en una proporción 1:1. Debido a la pobre solubilidad del complejo en agua, para evitar su precipitación la concentración usada nunca fue mayor de 500 μM (Bagui *et al.*, 1996).

Para la modificación con Cu(OP)_2 , una alícuota de enzima pura (170-200 $\mu\text{g/mL}$) se sometió a una columna de Sephadex G-25, bajo las mismas condiciones usadas para la modificación con los reactivos para monotoles descritas anteriormente. Esta preparación de enzima se incubó con Cu(OP)_2 por los tiempos indicados tras lo cual se agregó un exceso molar de EDTA (5 mM) para detener la inactivación. Se determinó el efecto del Cu(OP)_2 sobre la actividad enzimática en función del tiempo de incubación, la reversión de la

modificación por DTT y la protección de la actividad que los diferentes ligandos ofrecen frente a esta modificación, como se describió anteriormente para el caso de reactivos específicos de monotoles.

Por otra parte, se realizó una electroforesis en gel de la enzima modificada con Cu(OP)_2 como se describió anteriormente de acuerdo al método de Laemmli (1970) excepto que el amortiguador de muestra contenía NEM 5 mM.

La enzima modificada con Cu(OP)_2 y tratada con un exceso de DTT (10 mM) se sometió a una cromatografía de exclusión molecular Superdex 200 HR10/30 (10 mm de diámetro por 30 cm de alto) acoplada a un sistema de HPLC de Waters. La columna se equilibró y eluyó con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5, conteniendo glicerol 20% (v/v) y KCl 25 mM a una velocidad de flujo de 0.3 ml/min.

Para la modificación con As-BAL, una alícuota de la enzima pura (20-30 $\mu\text{g/mL}$) en un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5 conteniendo β -mercaptoetanol 5 mM, sacarosa 10 % (p/v), EDTA 0.05 mM y KCl 12.5 mM se incubó con As-BAL por los tiempos indicados. En este caso la reacción puede llevarse a cabo en presencia de β -mercaptoetanol, por lo que no hay que eliminarlo previamente por filtración en gel como en el caso de los modificadores por reactivos para monotoles o por Cu(OP)_2 . Se tomaron alícuotas de 5 μL a diferentes intervalos de tiempo y se determinó en ellas la actividad enzimática remanente. La dilución de la alícuota en la cubeta de reacción (100 veces) evita que continúe la inactivación. Se determinó así el efecto de este complejo sobre la actividad enzimática en función del tiempo y de la concentración de reactivo. Por otra parte, también se analizó la reversibilidad de la modificación utilizando DTT y la protección por diferentes ligandos, como se describió anteriormente para el caso de reactivos específicos de monotoles.

C) Doble modificación de la BADH por reactivos específicos para grupos sulfhidrilo

Una alícuota de enzima pura (170-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue filtrada a través de una columna de Sephadex G-25 equilibrada con amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.5, conteniendo glicerol 20% (v/v) y KCl 25 mM, con el propósito de eliminar el β -mercaptoetanol siguiendo el método de Penefsky (1977). La preparación de enzima resultante fue incubada con NEM 50 μM durante 10 min o al aire durante 35 min en ausencia y presencia de los dos sustratos (betaína aldehído 10 mM y NADP^+ 5 mM), posteriormente fue filtrada a través de una columna de Sephadex G-25 para eliminar los sustratos y el exceso de NEM. En el caso de la enzima tratada con NEM, se agregó DTT 20 mM para detener la inactivación y posteriormente se realizó la filtración en gel. A continuación se trataron ambas preparaciones con As-BAL 250 μM o MMTS 5 μM . Se tomaron alícuotas de 5 μL a diferentes tiempos de incubación y se determinó en ellas la actividad enzimática remanente.

La reversión de la modificación química por MMTS de la enzima incubada al aire en ausencia y presencia de los dos sustratos se llevó a cabo utilizando DTT como se describió anteriormente.

VI. 7. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos experimentales se analizaron utilizando el programa de regresión no lineal MicroCal Origin (Microcal Software, Inc. Northhampton, Ma, USA).

Para el análisis de las cinéticas de inactivación se usaron las ecuaciones 1 ó 2, cuando se trataba de una inactivación total o parcial, respectivamente.

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

$$E_1/E_0 = E_2/E_0 + [1 - (E_2/E_0)] e^{-kt} \quad (2)$$

en donde E_t , E_0 y E_∞ son la actividad de la enzima BADH al tiempo t , al tiempo cero, y al tiempo infinito (tiempo ∞), respectivamente, y k es la constante de inactivación de pseudo-primer orden. La ecuación 2, también se usó para el ajuste de los datos experimentales de una reacción de inactivación reversible. En este último caso la constante de velocidad de primer orden, k , es la suma de dos constantes, k_1 , la constante de velocidad de segundo orden del paso de ida, y k_{-1} , la constante de primer orden del paso de regreso, de acuerdo a la ecuación 3:

$$k = k_1 [\text{Modificador}] + k_{-1} \quad (3)$$

Los datos obtenidos durante los tiempos iniciales de la cinética de inactivación por MMTS se ajustaron a la forma lineal de la ecuación 1 (ecuación 4).

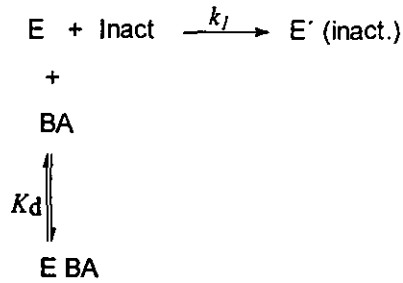
$$\ln (E_t/E_0) = -kt \quad (4)$$

El orden de reacción, n , con respecto a MMTS se determinó aplicando la ecuación descrita por Levy (1963).

$$\log k = \log k' + n \log [\text{MMTS}] \quad (5)$$

en donde k es la constante de velocidad de pseudo-primer orden, k' es la constante de segundo orden y n el orden de la reacción.

Los datos de protección total de betaína aldehído frente a la inactivación por MMTS se ajustaron a la ecuación 6 deducida a partir del mecanismo siguiente:



asumiendo condiciones de equilibrio en la unión de la BA.

$$k_{ap} = (k' \cdot K_d) / (K_d + [\text{BA}]) \quad (6)$$

en donde, k' es la constante de pseudo-primer orden en ausencia de ligando, determinada a partir del ajuste de los datos a la ecuación 1, y k_{ap} es la constante de pseudoprimer orden determinada en presencia del ligando. K_d es la constante de disociación del complejo enzima.ligando.

VII. RESULTADOS

VII. 1. PURIFICACIÓN DE BADH

Los resultados de una purificación típica son resumidos en la Tabla 1.

TABLA IV. Purificación de BADH de *P. aeruginosa*

| Pasos de purificación | Proteína total (mg) | Actividad total (U) | Actividad específica (U/mg prot) | Purificación (No. veces) | Rendimiento (%) |
|----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|--------------------------|-----------------|
| Extracto libre de células | 172 | 178 | 1.0 | 1.0 | 100 |
| Sefarosa Q de flujo rápido | 23 | 177 | 7.7 | 7.7 | 99 |
| 2'5'ADP sefarosa | 0.8 | 117 | 146.5 | 146.5 | 66 |

Resultados de una purificación típica empezando con 1.8 L de cultivo de bacterias en fase estacionaria.

VII. 2. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA BADH POR REACTIVOS ESPECÍFICOS PARA MONOTIOLES

VII. 2.1 Modificación por NEM

En primer lugar, investigamos la presencia de sulfhidrilo(s) esencial(es) incubando a la enzima con uno de los reactivos específicos para este tipo de grupos más usados en investigación, la NEM.

A) Cinética del proceso de inactivación de la BADH por NEM

La incubación de la enzima con NEM 25 μM , bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, produjo una inactivación total después de 90 min de incubación (Fig. 1). El ajuste de los datos experimentales de actividad residual a los diferentes tiempos de incubación se realizó usando la ecuación que describe una cinética de primer orden (ecuación 1), obteniéndose un valor para la constante de inactivación de pseudo-primer orden de $0.049 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ (Fig. 1) y una constante de segundo orden de $1.96 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Por otra parte, la actividad de la enzima control, que se incubó bajo las mismas condiciones pero en ausencia del modificador, se mantuvo constante durante todo el periodo de la incubación.

B) Protección por sustratos de BADH frente a su inactivación por NEM

Investigamos si la inactivación de la BADH podría ser la consecuencia de la modificación de un(os) grupo(s) sulfhidrilo(s) en o cercano(s) al sitio activo comprobando si los sustratos de la reacción protegían frente a la inactivación. Como se puede observar en la Fig. 1 cuando la modificación con NEM 25 μM se realizó en presencia de betaína aldehído 10 mM ó de NADP^+ 5 mM encontramos un cierto grado de protección frente a la inactivación, mayor en el caso de betaína aldehído que en el de NADP^+ , a pesar de que la concentración de betaína aldehído usada era sólo de ≈ 20 veces la $K_{m \text{ BA}}$ mientras que la de

NADP⁺ era ≈ 100 veces la K_m NADP⁺ (Velasco-García *et al.*, 1999). La presencia simultánea de ambos sustratos a las concentraciones indicadas anteriormente protegió totalmente a la enzima, aunque esta protección fue transitoria debido a su consumo en la reacción catalizada. A tiempos superiores a 35 min, ya se observa una progresiva inactivación. El ajuste de los datos experimentales a partir de los 35 min hasta los 120 min se hizo mediante la ecuación que describe una cinética de inactivación parcial (ecuación 2). El valor estimado para la constante aparente de inactivación es de $0.016 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$. La enzima después de 120 min presentó una actividad residual constante del 34% de la inicial. Un resultado interesante fue que en presencia de cualesquiera de los sustratos, la BADH se inactiva parcialmente aunque se deje incubando con NEM por tiempos largos. La enzima después de 120 min presentó una actividad residual constante del 18% de la inicial cuando la modificación se realizó en presencia de betaína aldehído, mientras que cuando se utilizó NADP⁺ como ligando protector la actividad residual fue del 10% de la inicial. Por ello, el ajuste de estos datos experimentales se hizo mediante la ecuación que describe una cinética de inactivación parcial (ecuación 2). Los valores estimados para las constantes aparentes de inactivación en presencia de betaína aldehído o de NADP⁺ son $0.039 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ y $0.026 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$, respectivamente (Fig. 1).

VII. 2.2 Modificación por MMTS

Para eliminar la posibilidad de que la inactivación por NEM fuera debida a que al estar este reactivo insertando un grupo muy voluminoso dentro de la proteína se bloqueara por impedimento estérico al grupo sulfhidrilo funcional, o se provocaran alteraciones conformacionales del sitio de unión al sustrato de la enzima, se decidió utilizar MMTS. Este reactivo actúa rápida y específicamente sobre grupos monotioles, introduciendo un grupo pequeño (-SCH₃) dentro de la proteína.

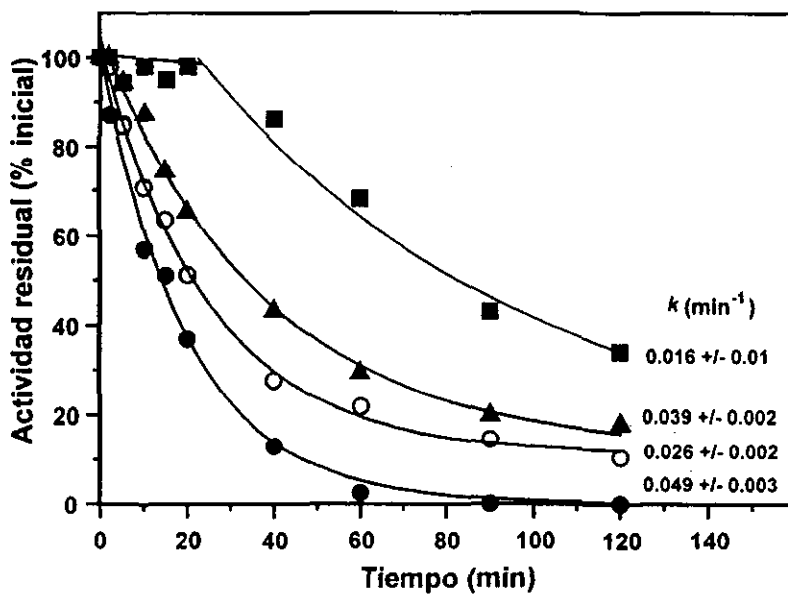


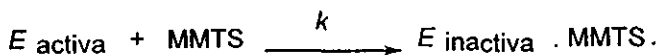
Figura 1. Inactivación de BADH por NEM y protección por sustratos. La enzima (0.956 μM) se incubó con NEM 25 μM en ausencia (●) o en presencia de NADP⁺ 5 mM (○), de BA 10 mM (▲) o de BA 10 mM + NADP⁺ 5 mM (■) bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1, para el caso de la enzima tratada con NEM en ausencia y presencia de los dos sustratos, o a la ecuación 2, para los datos de la enzima modificada en presencia de los sustratos. La enzima control que se incubó bajo idénticas condiciones experimentales pero en ausencia de NEM mantuvo constante su actividad durante el periodo de incubación.

A) Cinética del proceso de inactivación de BADH por MMTS

La incubación de la enzima con MMTS 5 μM conlleva su inactivación rápida y total, siguiendo una cinética de pseudo-primer orden (Fig. 2). El ajuste de los datos de actividad residual se realizó mediante la ecuación 1. El valor para la constante de inactivación de pseudo-primer orden así estimado es de $0.49 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$ (Fig. 2) y el valor de la constante de segundo orden es de $98 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, el cual es 50 veces superior al valor estimado para el proceso de inactivación con NEM ($1.96 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$) mostrado en la figura 1.

La enzima modificada es estable ya que se puede reactivar completamente aún iniciando la reactivación después de que la enzima ha permanecido inactiva por mucho tiempo (20 h). El ajuste de los datos de reactivación se realizó usando la ecuación 2, obteniéndose un valor de actividad en el equilibrio de $103 \pm 5\%$ y un valor para la constante de reactivación de $0.042 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$.

La dependencia de la constante de inactivación de la concentración de MMTS, en un intervalo de 0 a 10 μM , se observa en la Fig. 3A. El ajuste de los datos experimentales se realizó usando la ecuación para una cinética de primer orden (ecuación 1) obteniéndose los valores para las constantes de inactivación aparentes para cada concentración de MMTS. El regráfico de estas constantes contra la concentración de MMTS es de tipo lineal y pasa por el origen (Fig. 3B), lo cual indica que, al menos en el intervalo de concentración de MMTS usado en nuestros experimentos, la reacción de la enzima con MMTS no involucra la formación de un complejo transitorio entre la enzima y el MMTS, sino que ocurre de acuerdo a la siguiente reacción:



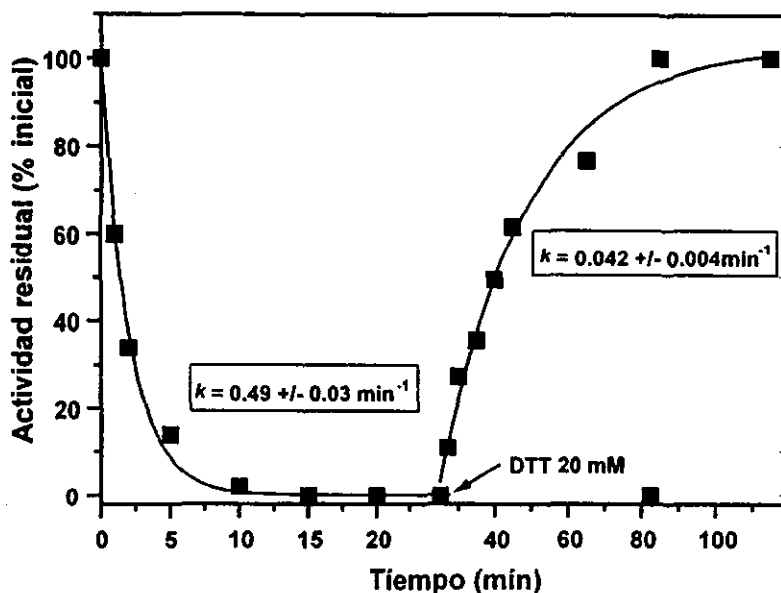


Figura 2. Inactivación de BADH por MMTS y reactivación por DTT. La enzima (0.407 μM) se incubó con MMTS 5 μM como se indica en Materiales y Métodos. Después de 30 min, a la mezcla de incubación se le agregó DTT 20 mM para revertir el efecto del MMTS. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH. Los datos de inactivación se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación 1 y los datos de reactivación a la ecuación 2, ambas descritas en Materiales y Métodos. Las líneas son las teóricas obtenidas con este ajuste.

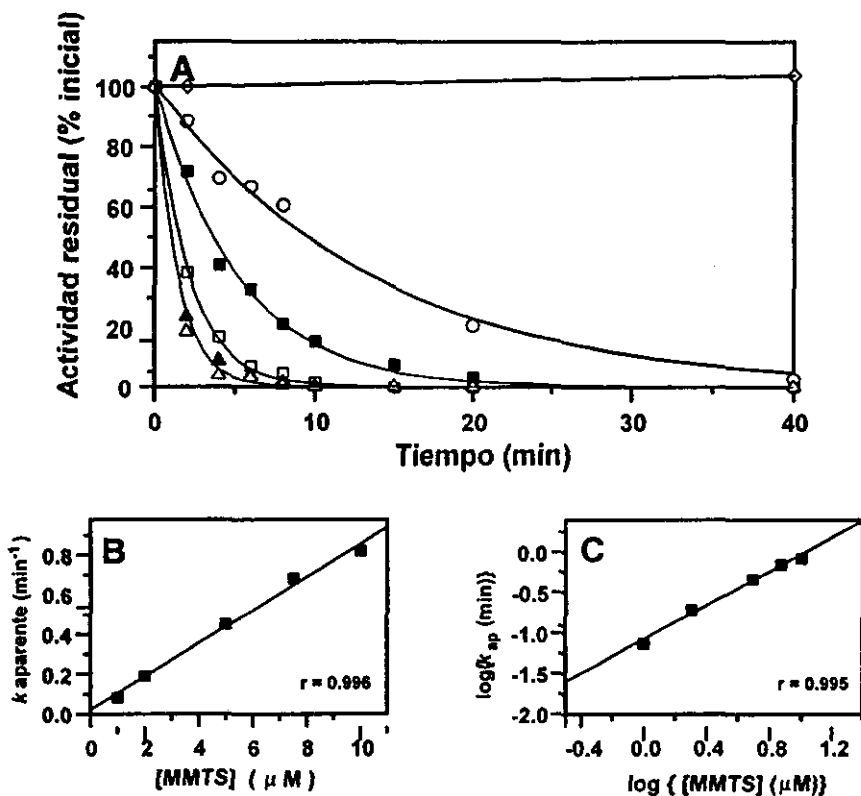


Figura 3. Dependencia de la inactivación de BADH de la concentración de MMTS. (A) La enzima ($0.407 \mu\text{M}$) se incubó en ausencia (\diamond) o en presencia de MMTS $1 \mu\text{M}$ (O), $2 \mu\text{M}$ (\blacksquare), $5 \mu\text{M}$ (\square), $7 \mu\text{M}$ (\blacktriangle) y $10 \mu\text{M}$ (\triangle) bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1. **(B)** Dependencia de la constante aparente de velocidad de inactivación de pseudo-primer orden (k) de la concentración de MMTS. **(C)** Determinación del orden de reacción para MMTS acorde a la ecuación 5 descrita en Materiales y Métodos.

A partir de la Fig. 3B calculamos un valor para la constante de velocidad de inactivación de segundo orden (k) de $83.4 \pm 4.3 \text{ mM}^{-1} \text{ min}^{-1}$, valor que es cercano al obtenido anteriormente usando una sola concentración de MMTS. La gráfica del logaritmo de la constante aparente de velocidad de pseudo-primer orden contra el logaritmo de la concentración de MMTS es de tipo lineal con una pendiente de 1.04 ± 0.05 ($r = 0.995$) (Fig. 3C), lo cual es consistente con una reacción de primer orden con respecto al MMTS.

B) Protección por ligandos de BADH frente a su inactivación por MMTS

Se investigó la posible protección por los ligandos de la enzima, los sustratos NAD(P)⁺ y betaina aldehído y los productos NAD(P)H. Las concentraciones usadas de los ligandos fueron al menos 10 veces superiores al valor de sus respectivas K_m o K_i (Velasco-García *et al.*, manuscrito sometido). Como podemos observar en la Fig. 4 todos los ligandos ofrecen cierta protección frente a la inactivación por MMTS. Los valores de las constantes de velocidad aparentes del proceso de inactivación en presencia de cada ligando se incluyen en la Tabla V.

TABLA V. Protección por ligandos de BADH frente a su inactivación por MMTS^a

| [Ligando] | $k_{obs} \text{ (min}^{-1}\text{)}^b$ | % Protección ^c |
|-------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| Ninguno | 0.49 ± 0.05 | - |
| BA 10 mM | 0.09 ± 0.01 | 82 |
| NADP ⁺ 5 mM | 0.18 ± 0.03 | 63 |
| NAD ⁺ 3.5 mM | 0.17 ± 0.02 | 65 |
| NADPH 3.5 mM | 0.27 ± 0.06 | 45 |
| NADH 5 mM | 0.24 ± 0.05 | 51 |
| NADP ⁺ + BA | 0 | 100 |

^aLa enzima se incubó con MMTS 5 μM en ausencia o presencia de los ligandos indicados bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La actividad de la enzima se determinó a diferentes tiempos en un intervalo de 10 min. ^bLos valores de las constantes de inactivación de pseudo-primer orden se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1. ^cCalculado a partir de los valores de $\Delta k = k_0 - k_{ap}$, siendo k_0 y k_{ap} las k_{obs} en ausencia y presencia de ligandos, respectivamente.

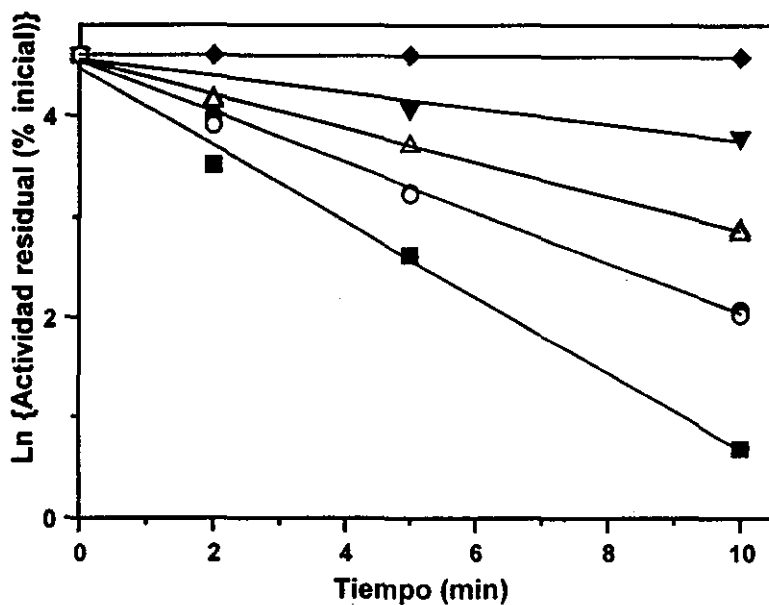


Figura 4. Protección por ligandos de BADH frente a su inactivación por MMTS. Gráfico del logaritmo de la actividad residual contra el tiempo de incubación con MMTS 5 μM en ausencia (■) o en presencia de NADH 5 mM (O), NADPH 3.5 mM (●), NADP⁺ 5 mM (▲), NAD⁺ 3.5 mM (Δ), BA 10 mM (▼) y NADP⁺ 5 mM + BA 10 mM (◆). La enzima (0.815 μM) se incubó bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron del mejor ajuste de los datos a la ecuación 4 descrita en Materiales y Métodos.

El ligando que ofrece mayor protección frente a la inactivación por MMTS es la betaína aldehído, que a la concentración estudiada reduce 5 veces el valor de la constante de inactivación obtenido en ausencia de ligandos. Por otra parte, el NADP^+ y el NAD^+ protegen en un grado muy semejante reduciendo el valor de la constante de inactivación 3 veces. Igual ocurre en el caso del NADPH y el NADH , en presencia de los cuales el valor de la constante de inactivación es 2 veces inferior al obtenido en ausencia de ligandos. Cuando la modificación se realizó en presencia de los dos sustratos (betaína aldehído y NADP^+) a concentraciones saturantes se observó una protección total durante los primeros minutos de la incubación, al igual que en el caso de la modificación con NEM. Estos resultados indican que de las cuatro cisteínas que posee la BADH de *P. aeruginosa* al menos una de ellas es esencial para la actividad de la enzima.

Cuando la enzima se incubó con MMTS $5 \mu\text{M}$ en presencia de betaína aldehído 10 mM como en el experimento anterior, pero por un tiempo más largo (60 min), pudimos observar que la inactivación bajo estas condiciones es parcial, quedando la enzima con una actividad residual del 8% de la inicial. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación 2, obteniéndose un valor para la constante de inactivación de $0.09 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ (Fig. 5).

La protección que ejerce NADP^+ frente a la inactivación por MMTS es claramente parcial, dado que a una concentración aproximadamente 100 veces la K_i para este sustrato (60 veces su K_m) sólo protege en un 63% (Tabla V). Con respecto a betaína aldehído no era tan claro este punto, por lo que quisimos investigar si la protección ofrecida por este sustrato frente a la inactivación por MMTS era total o parcial. Para ello se incubó a la enzima con una concentración fija de MMTS ($5 \mu\text{M}$) en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de betaína aldehído y los resultados se muestran en la Fig. 6A. Los datos experimentales obtenidos durante la fase inicial de la modificación se ajustaron usando la ecuación para una cinética de primer orden (ecuación 1) obteniéndose los valores de las constantes aparentes de inactivación para cada concentración de betaína aldehído. Cuando se graficaron los incrementos en las constantes de inactivación producidas por betaína aldehído frente a la concentración de este sustrato se observa una dependencia hiperbólica,

que permite calcular el valor de la constante de disociación de este sustrato del complejo que forma con la enzima. La gráfica 6B nos muestra los valores k_{ap} . Los datos se ajustaron a la ecuación 6, obteniéndose un valor para la constante de protección (K_d) de 1.35 ± 0.07 mM. Ello indica que la betaína aldehído ofrece una protección total frente a la inactivación por MMTS.

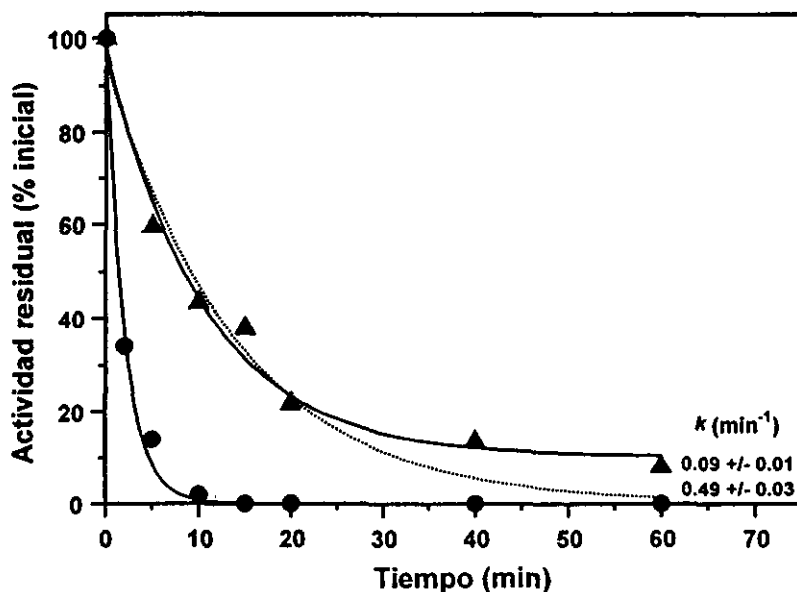


Figura 5. Inactivación parcial de BADH por MMTS en presencia de BA. La enzima ($0.543 \mu\text{g/mL}$) se incubó con MMTS $5 \mu\text{M}$ en ausencia (●) y en presencia de BA 10 mM (▲) bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación 1, para el caso de la enzima tratada con MMTS en ausencia de ligandos, y a la ecuación 2, para los datos de la enzima modificada en presencia de BA. La línea punteada es el resultado del ajuste de los datos en presencia de BA a la ecuación 1.

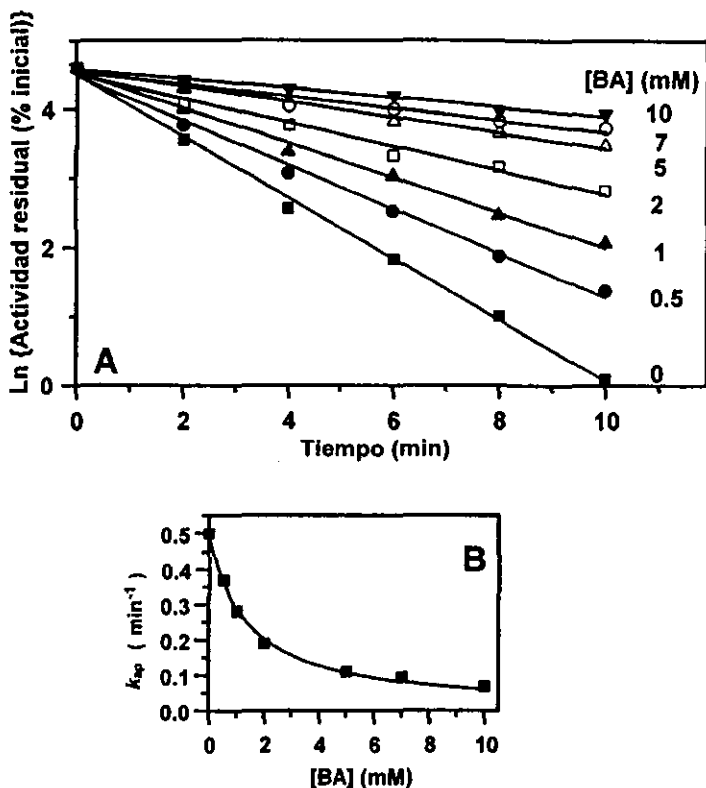


Figura 6. Protección de BADH por BA frente a la inactivación por MMTS. (A) Gráfico del logaritmo de la actividad residual contra el tiempo de incubación con MMTS 5 μ M en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de BA. La enzima (1.12 μ M) se incubó bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación 4. (B) Dependencia de k_{ap} de la concentración de BA. Las líneas son teóricas y se obtuvieron del mejor ajuste de los datos a la ecuación 6.

VII. 3. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA BADH POR REACTIVOS ESPECÍFICOS PARA SULFHIDRILOS VECINALES.

VII. 3. 1 Modificación por Cu(OP)_2

Como una primera aproximación investigamos la presencia de cisteínas vecinales en la BADH de *P. aeruginosa* usando Cu(OP)_2 , que es un eficiente catalizador de la oxidación de tioles a disulfuro por oxígeno molecular, oxidación que puede ser revertida con un reductor como DTT.

A) Cinética del proceso de inactivación de la BADH por Cu(OP)_2 y protección por sus sustratos

La incubación de la enzima con Cu(OP)_2 200 μM bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos produjo una inactivación total después de 90 min de incubación (Fig. 7) indicando la existencia de cisteínas vecinas en la estructura de la BADH. El Cu(SO)_4 por sí mismo no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima. La o-fenantrolina también fue inefectiva en este respecto. Por otra parte, la actividad de la enzima control que se incubó bajo las mismas condiciones pero en ausencia del complejo modificador se mantuvo constante durante el periodo de la incubación (Fig. 7).

La inactivación producida por Cu(OP)_2 no pudo ser revertida por incubación de la enzima modificada con un exceso de DTT (20 mM), aún cuando la incubación con DTT se prolongó por tiempos muy largos (24 h). Puesto que la cinética de inactivación de la BADH por Cu(OP)_2 parecía sugerir la presencia de dos fases en la inactivación, la primera de las cuales podría ser reversible, en un intento de lograr revertir esta modificación se incubó la enzima con Cu(OP)_2 200 μM durante 20 min hasta que perdió aproximadamente el 40% de su actividad inicial, tras lo cual se agregó al medio de incubación EDTA 5 mM para detener la inactivación y DTT 20 mM. De esta forma se pudo recuperar únicamente el 15% de la

actividad original y un 41% de la actividad perdida (Fig. 8). El ajuste de estos datos experimentales se realizó usando la ecuación 2 obteniéndose un valor estimado para la constante de velocidad de inactivación de $0.33 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$ y de reactivación de $0.03 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$.

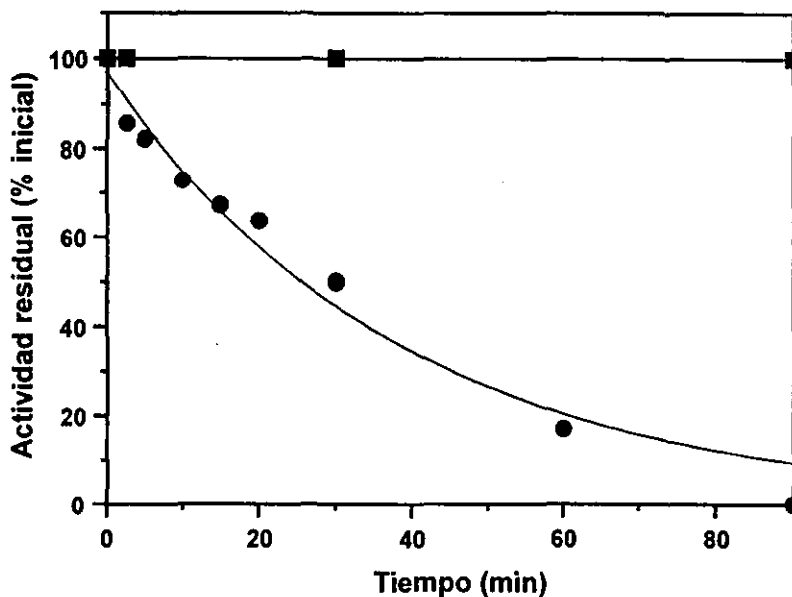


Figura 7. Inactivación de BADH por $\text{Cu}(\text{OP})_2$. La enzima ($0.514 \mu\text{M}$) se incubó en ausencia (■) (control) y presencia de $\text{Cu}(\text{OP})_2$ $200 \mu\text{M}$ (●) como se indica en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH. Los datos de inactivación se ajustaron por regresión no lineal a una ecuación de una doble exponencial. La línea de los datos de inactivación es la teórica obtenida con este ajuste.

Estos resultados parecían indicar que la enzima modificada era muy inestable, sufriendo un paso de inactivación irreversible después de la modificación y por tanto, sugerían que las cisteínas oxidadas a cistina pudieran estar involucradas en la estabilidad de la enzima. Para investigar si este era el caso y/o se encontraban en el sitio activo, se llevaron a cabo experimentos de protección incubando a la enzima con una concentración fija de Cu(OP)_2 en presencia y en ausencia de sus sustratos. Como podemos observar en la Fig. 8, ninguno de los sustratos ofrece protección frente a la inactivación por Cu(OP)_2 , y además en ninguno de los casos se pudo recuperar totalmente la actividad inicial por la adición de DTT, aunque la velocidad de la reactivación parcial fue superior a la obtenida en ausencia de ligandos. Por otra parte el NADP^+ no sólo parece no proteger a la enzima frente a Cu(OP)_2 sino aumentar la inactivación. Los valores estimados para las constantes de velocidad de inactivación en presencia de NADP^+ y de betaína aldehído son $0.30 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$ y $0.19 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$, respectivamente mientras que los valores estimados para las constantes de reactivación en presencia de betaína aldehído y de NADP^+ son $0.18 \pm 0.06 \text{ min}^{-1}$ y $0.20 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$.

Los resultados de la electroforesis en gel de la enzima modificada y totalmente inactivada con Cu(OP)_2 se observan en la Figura 9. La banda correspondiente a la enzima sin modificar tiene un aparente M_r de 61 kDa (Fig. 9, carril 1). Mientras que en la enzima modificada por Cu(OP)_2 se observa un cambio en la movilidad electroforética con un aparente M_r de 57.2 kDa (Fig. 9, carril 2). Este aumento en la movilidad electroforética del puente disulfuro intramolecular formado puede ser debido a un desplegamiento incompleto de la proteína por SDS que altera su movilidad y produce una masa molecular aparente menor. La enzima inactivada y tratada posteriormente con un exceso de DTT (10 mM) tiene un aparente M_r de 61 kDa, que es igual al de la enzima sin modificar (Fig. 9, carril 3) indicando que el DTT fue capaz de romper el puente disulfuro intramolecular formado por el Cu(OP)_2 .

Cuando se sometió a la enzima modificada con Cu(OP)_2 y tratada con un exceso de DTT (10 mM) a una cromatografía de exclusión molecular (Superdex 200 HR10/30, acoplada a un sistema de HPLC de Waters) se comprobó que la modificación conlleva una agregación de la enzima (Fig. 10B), lo que explica el que no se pueda revertir el efecto del Cu(OP)_2 con DTT.

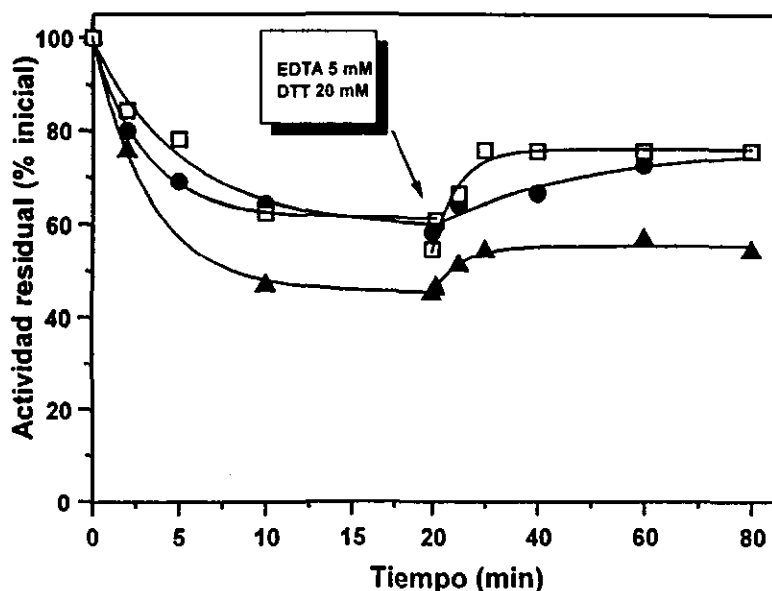


Figura 8. Inactivación de BADH por Cu(OP)_2 y protección por sus ligandos. La enzima ($0.448 \mu\text{M}$) se incubó con Cu(OP)_2 $200 \mu\text{M}$ en ausencia (●) y en presencia de NADP^+ 5 mM (▲) y BA 10 mM (□) bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Después de 20 min, a la mezcla de incubación se le agregó EDTA 5 mM para detener la reacción y DTT 20 mM para revertir el efecto de Cu(OP)_2 . A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación 2.

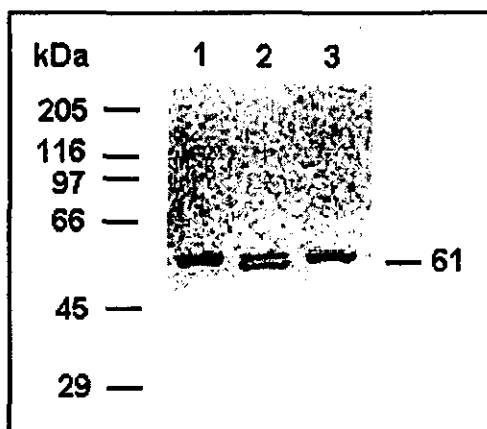


Figura 9. Efecto sobre la movilidad electroforética de la BADH modificada por Cu(OP)_2 . Línea 1, enzima pura. Línea 2, enzima tratada con Cu(OP)_2 200 μM bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Después de 90 min, a la mezcla de incubación se le agregó EDTA 5 mM para detener la reacción. Línea 3, igual que la línea anterior pero además tratada con DTT 10 mM durante 60 min para revertir el efecto de Cu(OP)_2 . En todos los casos se utilizó el amortiguador de muestra con NEM 5 mM. Las siguientes proteínas se utilizaron como estándares M_r : miosina de músculo de conejo (205,000), β -galactosidasa de *E. coli* (116,000), fosforilasa b de músculo de conejo (97,400), albúmina de plasma de bovino (66,000), ovoalbúmina (45,000) y anhidrasa carbónica de eritrocitos de bovino (29,000).

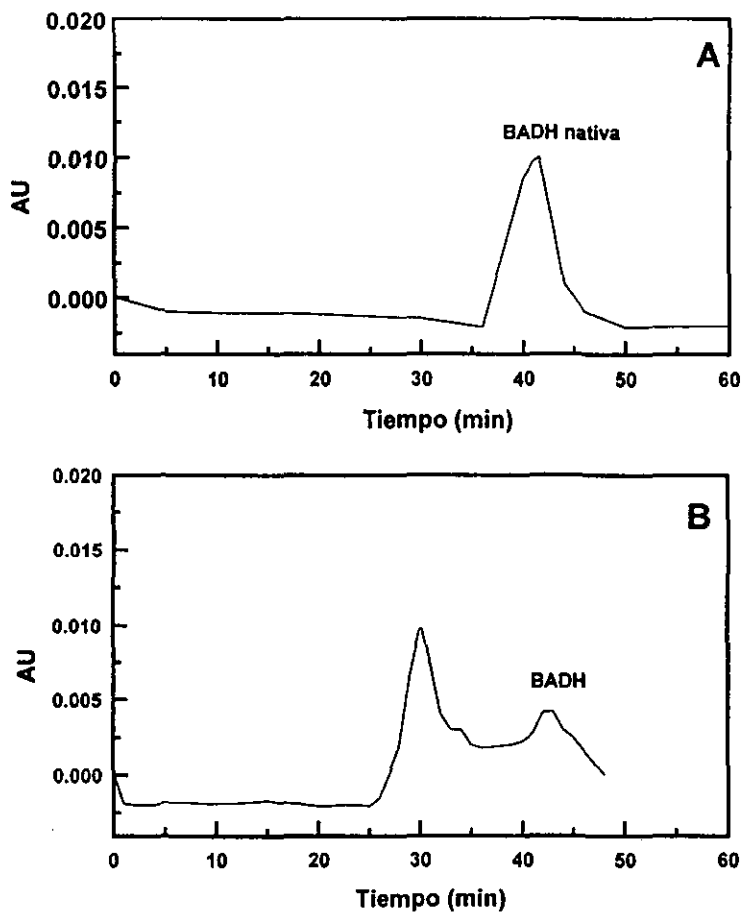


Figura 10. Cromatografía de exclusión molecular de la BADH. A) Enzima pura. B) Enzima modificada con Cu(OP)_2 200 μM bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Después de 120 min, a la mezcla de incubación se le agregó EDTA 5 mM para detener la reacción y DTT 10 mM durante 60 min para revertir el efecto de Cu(OP)_2 .

VII. 3. 2 Modificación por As-BAL

En vista de los resultados obtenidos con Cu(OP)_2 decidimos utilizar otro reactivo para sulfhidrilos vecinales, el As-BAL. Este reactivo actúa sobre dos grupos tioles formando un ditioarsenito cíclico estable y su efecto puede ser revertido utilizando un ditiol como el DTT como se describe en Antecedentes.

A) Cinética del proceso de inactivación de la BADH por As-BAL

La incubación de la enzima con As-BAL 250 μM bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos produjo una inactivación parcial. Como se puede observar en la Fig. 11, la actividad de la enzima disminuye hasta alcanzar una meseta después de 15 min de incubación, quedando con una actividad residual del 62% de la inicial. El ajuste de los datos experimentales se realizó usando la ecuación 2, estimándose un valor para la constante de inactivación aparente de $0.60 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$. Por otra parte, el As por sí mismo no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima y el BAL también fue inefectivo en este respecto.

La reversibilidad de esta reacción de inactivación se confirmó con la reactivación total por DTT de la enzima previamente modificada con As-BAL, como se muestra en la Fig. 11. La enzima se incubó con As-BAL hasta que perdió aproximadamente el 40% de su actividad inicial, tras lo cual se agregó al medio de incubación DTT 20 mM, recuperándose gradualmente el 100% de la actividad original. El ajuste de estos datos experimentales se realizó usando la ecuación 2 obteniéndose un valor para la constante de velocidad de reactivación de $0.13 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$.

La dependencia del proceso de inactivación de la concentración de As-BAL se observa en la Fig. 12. Los datos experimentales se ajustan a la ecuación 2 obteniéndose los valores para las constantes de inactivación de pseudo-primer orden para cada concentración de As-BAL.

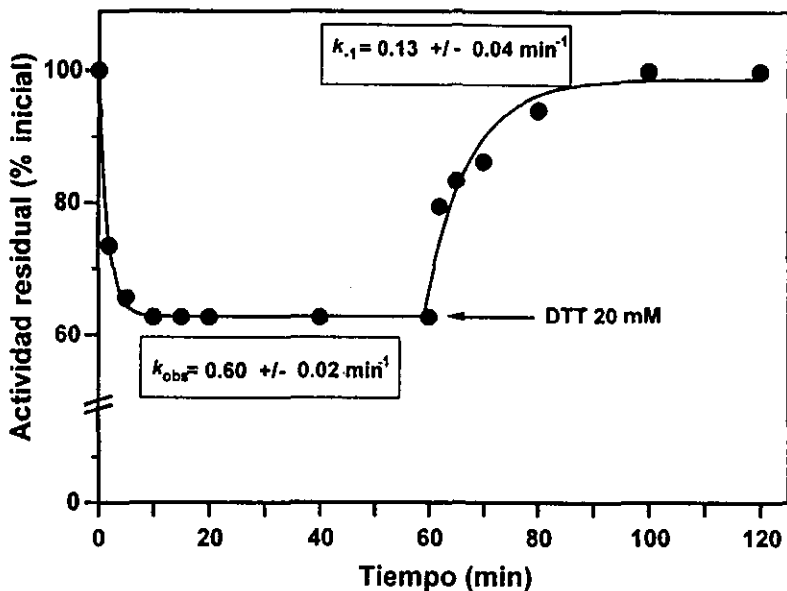


Figura 11. Inactivación de BADH por As-BAL y reactivación por DTT. La enzima (0.14 μM) se incubó con As-BAL 250 μM como se indica en Materiales y Métodos. Después de 60 min, a la mezcla de incubación se le agregó DTT 20 mM para revertir el efecto del As-BAL. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad de la BADH. Los datos experimentales de inactivación y reactivación se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación 2. Las líneas son las teóricas obtenidas con este ajuste.

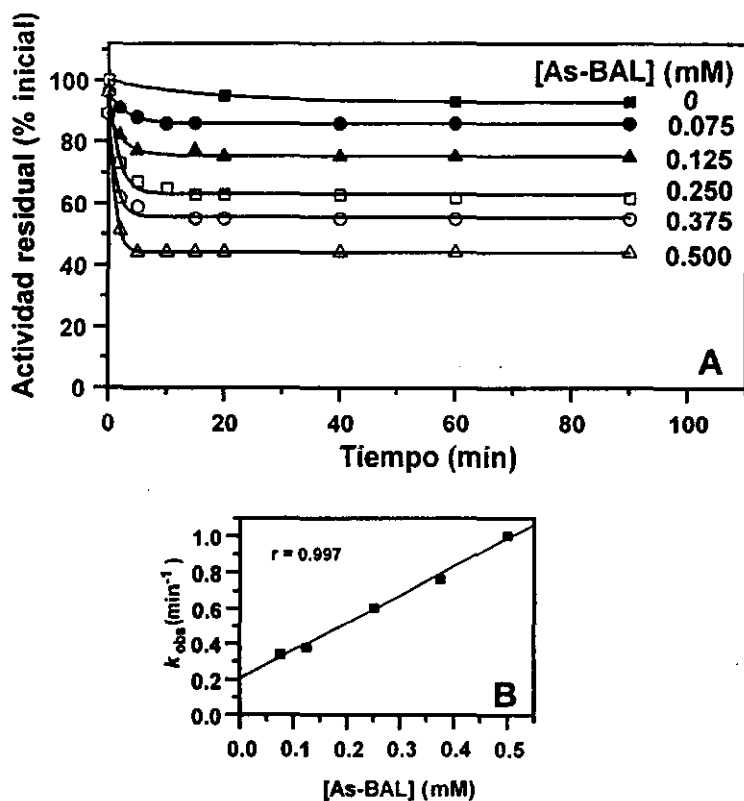


Figura 12. Dependencia de la inactivación de BADH de la concentración de As-BAL. (A) La enzima (0.102 μ M) se incubó con diferentes concentraciones de As-BAL bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron de los mejores ajustes de los datos experimentales a la ecuación 2. (B) Dependencia de la constante de velocidad de inactivación (k_{obs}) de la concentración de As-BAL.

La gráfica de las constantes de inactivación contra la concentración de As-BAL a la que se obtuvieron (Fig. 12B) permite calcular una constante de velocidad de inactivación de segundo orden (k_{+1}) y una constante de reactivación de pseudo-primer orden (k_{-1}). Los valores estimados se incluyen en la Tabla VI.

TABLA VI. Constantes de velocidad del proceso de inactivación de la BADH por As-BAL^a

| Ligando | k_{+1} ^b (mM ⁻¹ min ⁻¹) | k_{-1} ^b (min ⁻¹) | K_{eq} ^c (mM ⁻¹) |
|------------------------|---|--|---|
| Ninguno | 1.57 ± 0.07 | 0.20 ± 0.02 | 7.8 |
| BA 5 mM | 0.66 ± 0.03 | 0.07 ± 0.00 | 9.2 |
| NADP ⁺ 1 mM | 0.61 ± 0.06 | 0.06 ± 0.02 | 10.3 |

^aLa enzima se incubó con diferentes concentraciones de As-BAL en presencia de los ligandos indicados bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. La actividad de la enzima se determinó a diferentes intervalos de tiempo. ^bLos valores de las constantes se obtuvieron mediante el ajuste de los datos experimentales a la ecuación 3. ^cCalculada por la razón k_{+1} / k_{-1} .

B) Protección por los sustratos de la BADH frente a su inactivación por As-BAL

Los experimentos de protección por sustratos inicialmente se llevaron a cabo incubando a la enzima con una concentración fija de As-BAL en presencia y en ausencia de los ligandos indicados. Los datos experimentales se ajustaron a la ecuación 2 obteniéndose los valores de las constantes de velocidad aparentes de inactivación de cada ligando. Como podemos observar en la Fig. 13, el sustrato que ofrece protección frente a la inactivación por As-BAL es de nuevo la betaína aldehído, mientras que el NADP⁺ parece no sólo no proteger a la enzima sino aumentar la inactivación. Cuando la modificación se realizó en presencia de los dos sustratos a concentraciones saturantes se observó una protección total. Estos resultados nos indican que existe un par de sulfhidrilos vecinales, de los cuales al menos uno tiene que ser esencial, ya que se logró una protección total por la presencia de los dos sustratos.

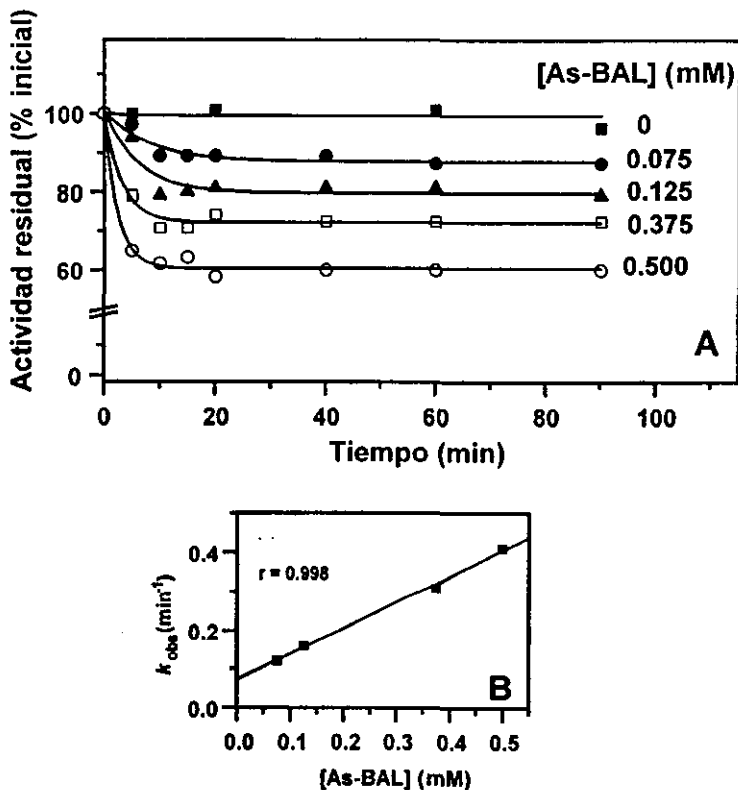


Figura 14. Protección por BA de BADH frente a su inactivación por As-BAL. (A) La enzima ($0.102 \mu\text{M}$) se incubó con 5 mM de BA en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de As-BAL bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron de los mejores ajustes de los datos experimentales a la ecuación 2. (B) Dependencia de la constante de velocidad de inactivación (k_{obs}) de la concentración de As-BAL.

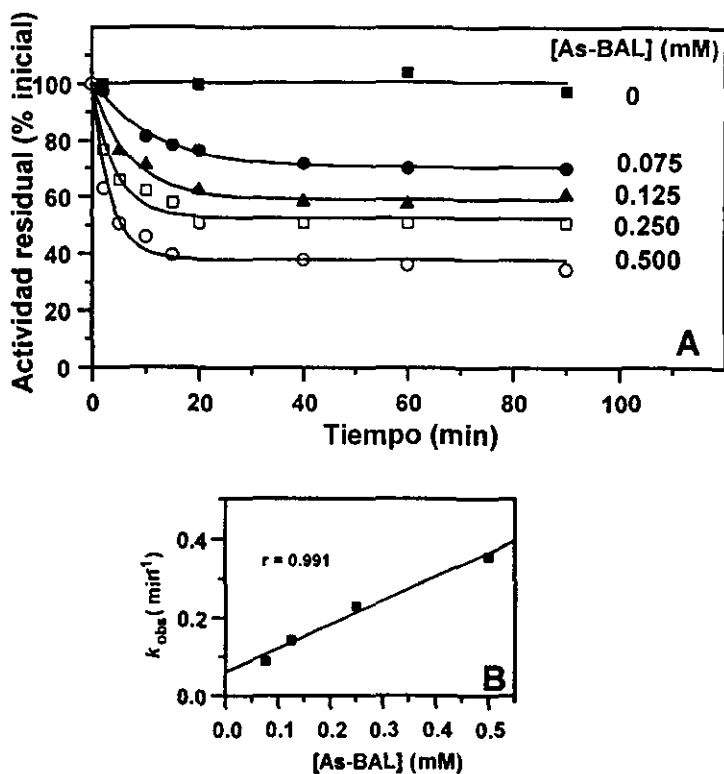


Figura 15. Protección por NADP^+ de BADH frente a su inactivación de BADH por As-BAL. (A) La enzima ($0.102 \mu\text{M}$) se incubó con NADP^+ 1 mM en ausencia y en presencia de diferentes concentraciones de As-BAL bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron de los mejores ajustes de los datos experimentales a la ecuación 2. (B) Dependencia de la constante de velocidad de inactivación (k_{obs}) de la concentración de As-BAL.

VII. 4. DOBLE MODIFICACIÓN DE LA BADH CON REACTIVOS ESPECÍFICOS DE GRUPOS SULFHIDRILLO

La capacidad de los dos sustratos para proteger a la enzima contra la inactivación por modificación de cisteínas nos dió la posibilidad de estudiar los efectos de un doble tratamiento con reactivos modificadores de grupos sulfhidrilo incubando a la enzima con el primer reactivo en presencia de los sustratos y posteriormente en su ausencia con el segundo reactivo.

VII. 4. 1. Modificación secuencial por NEM y As-BAL

La enzima se incubó con NEM 50 μM en ausencia y presencia de concentraciones saturantes de los sustratos por un periodo de tiempo en el que hay protección total por los sustratos. La enzima no protegida pierde actividad siguiendo una cinética de pseudo-primer orden, como era de esperarse, quedando tras los 10 min de incubación una preparación enzimática con sólo el 20% de la actividad inicial (Fig. 16A). En este punto se detuvo la reacción con un exceso de DTT y tras eliminar los sustratos y el sobrante de DTT y DTT-NEM, se observó que la enzima se inactivó por As-BAL con una cinética idéntica a la de una enzima que no haya sido preincubada con NEM. La constante de velocidad de inactivación fue igual a 0.60 min^{-1} , valor prácticamente idéntico al observado en la enzima no preincubada. Por el contrario, la enzima que permaneció totalmente activa tras la incubación con NEM en presencia de los sustratos ya no fue posible inactivarla con As-BAL, reteniendo toda la actividad a pesar de que la incubación con este reactivo se realizó por un largo tiempo (90 min).

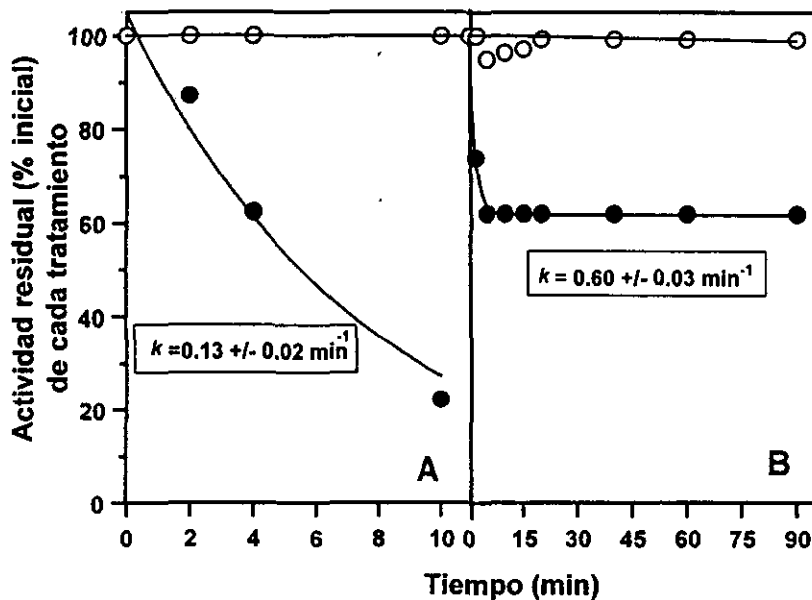


Figura 16. Tratamiento secuencial de BADH por NEM y por As-BAL. A) Tratamiento con NEM. La enzima ($0.841 \mu\text{M}$) se incubó con NEM $50 \mu\text{M}$ en ausencia (\bullet) o en presencia de BA 10 mM + NADP^+ 5 mM (O). Después de un periodo de 10 min se agregó DTT 20 mM y la enzima fue filtrada a través de una columna de Sephadex G-25 para eliminar los sustratos, el exceso de NEM y el DTT. B) Tratamiento con MMTS. La enzima fue tratada con As-BAL $250 \mu\text{M}$ bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron de los mejores ajustes de los datos experimentales a la ecuación 1, para el caso de la enzima tratada con NEM en ausencia de los sustratos, o a la ecuación 2, para el caso de la enzima tratada con NEM en presencia de BA + NADP^+ .

VII. 4. 2. Modificación secuencial por NEM y MMTS

Los resultados anteriormente descritos parecían indicar que la presencia de ambos sustratos inducían un cambio conformacional en la enzima que afectaba la reactividad de un sulfhidrilo no esencial. Quisimos comprobar si también se afectaba la reactividad del o los sulfhidrilo(s) esencial(es), para lo cual la enzima se incubó con NEM 50 μM en ausencia y presencia de concentraciones saturantes de los sustratos por un tiempo (10 min) que permite la protección total de la actividad por éstos, y que conlleva a un 80% de inactivación de la enzima no protegida. Luego de eliminar el NEM que no había reaccionado y los sustratos protectores por filtración en gel, expusimos ambas muestras a MMTS 5 μM (Fig. 17). Encontramos que la actividad residual de la enzima modificada con NEM en ausencia de sustratos se pierde totalmente durante el tratamiento subsiguiente con MMTS, siguiendo una cinética de inactivación de primer orden con un valor de $k = 0.38 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$, muy semejante al obtenido con la enzima sin preincubar (Fig. 2). Sin embargo, aquella enzima cuya actividad había sido protegida durante la preincubación por la presencia de los dos sustratos se inactiva en presencia de MMTS de una forma más lenta $k = 0.21 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ y sólo parcialmente, quedando un 18% de la actividad resistente a la modificación por MMTS.

Este resultado confirma que la presencia de los sustratos durante la modificación de la enzima por un reactivo para monotioles como NEM no sólo protege la actividad sino que produce una enzima modificada en grupos sulfhidrilos no esenciales diferente a la obtenida cuando la modificación se hace en ausencia de sustratos.

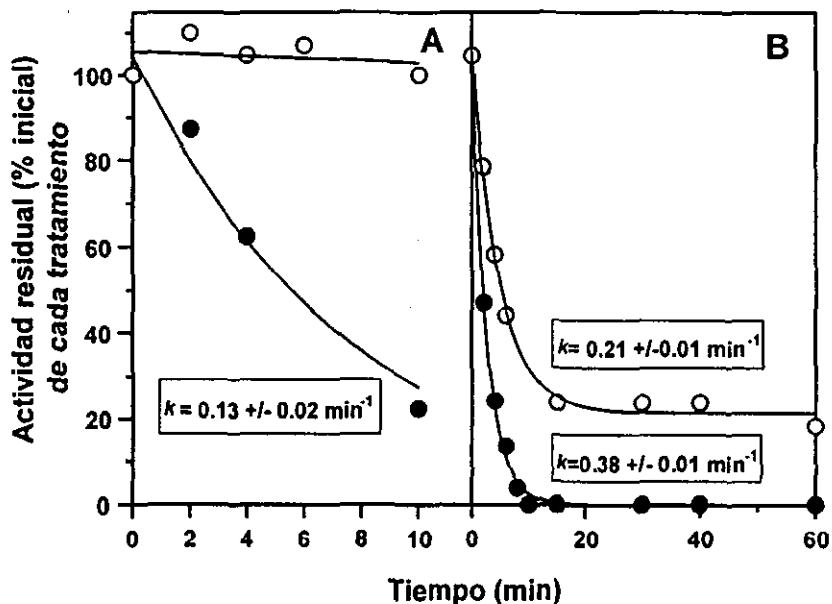


Figura 17. Tratamiento secuencial de BADH por NEM y por MMTS. A) Tratamiento con NEM, la enzima ($0.794 \mu\text{M}$) se incubó con NEM $50 \mu\text{M}$ en ausencia (●) o en presencia de BA 10 mM + NADP^+ 5 mM (O). Después de un periodo de 10 min se agregó DTT 20 mM y la enzima fue filtrada a través de una columna de Sephadex G-25 para eliminar los sustratos, el exceso de NEM y el DTT. B) Tratamiento con MMTS, la enzima fue tratada con MMTS $5 \mu\text{M}$ bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y se obtuvieron de los mejores ajustes de los datos experimentales a la ecuación 1, para el caso de la enzima tratada con NEM en ausencia de los sustratos, o a la ecuación 2, para el caso de la enzima modificada con NEM en presencia de BA + NADP^+ .

VII. 4. 3. Modificación secuencial por oxidación por el oxígeno ambiental y posteriormente por MMTS

La modificación de un residuo de cisteína por NEM introduce un grupo muy voluminoso en la proteína que podría por impedimentos estéricos impedir la posterior modificación de algún otro residuo de cisteína que se encontrase cercano en la estructura terciaria. Esto podría explicar los resultados descritos en los dos apartados anteriores. De ser así, este hecho no tendría ninguna implicación en la protección de la actividad de BADH *in vivo*, ya que bajo condiciones fisiológicas la enzima no encuentra reactivos del tipo de los modificadores usados. Sin embargo, si podría estar sometida a condiciones oxidantes bajo circunstancias especiales, como sería estrés oxidativo.

Quisimos por ello investigar si la oxidación espontánea de alguna(s) de la(s) cisteína(s) no esenciales por el oxígeno ambiental en presencia de sustratos para proteger a la cisteína esencial es capaz de proteger a la(s) cisteína(s) esencial(es) frente a la modificación química aún en ausencia de sustratos cuando la enzima oxidada se incubaba en presencia de un reactivo específico de grupos sulfhidrilo.

La incubación de la enzima en una solución no desgasada y en ausencia de agentes reductores durante 35 min produjo una disminución de la actividad de la BADH quedando ésta al 80%, mientras que la enzima protegida por ambos sustratos presentó una actividad del 96% después del mismo tiempo de exposición al oxígeno ambiental.

La enzima expuesta a la oxidación por el oxígeno del ambiente en ausencia de sustratos y después tratada con MMTS 5 μM bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos se inactivó totalmente después de 10 min de incubación con el reactivo (Fig. 18). El ajuste de los datos obtenidos durante la incubación con MMTS se realizó usando la ecuación para una cinética de primer orden (ecuación 1), con el cual se obtuvo un valor para la constante de velocidad de pseudo-primer orden de inactivación de $0.45 \pm 0.02 \text{ min}^{-1}$ (Fig. 18), valor que es prácticamente igual al valor estimado para la inactivación por MMTS de

la BADH sin preincubación al aire ($0.49 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$). La actividad de la enzima modificada por MMTS se recuperó por la adición de un exceso de DTT (20 mM). El ajuste de los datos de reactivación se realizó usando la ecuación 2, obteniéndose un valor para la constante de velocidad de pseudo-primer orden de reactivación de $0.04 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ y una actividad estimada al equilibrio de 64%.

Por otra parte, la enzima cuya actividad había sido protegida durante la preincubación bajo condiciones no reductoras por la presencia de los dos sustratos se inactiva de una forma más lenta y sólo parcialmente por el MMTS quedando con una actividad residual del 30% de la inicial (Fig. 18). El ajuste de los datos experimentales se realizó usando la ecuación 2, con el cual se obtuvo un valor para la constante de inactivación de $0.35 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$. La actividad de la enzima modificada por MMTS se recuperó al 100% por la adición de un exceso de DTT 20 mM. El ajuste de los datos de reactivación se realizó usando la ecuación 2, obteniéndose un valor para la constante de velocidad de pseudo-primer orden del proceso de reactivación de $0.05 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$.

Este resultado apoya la conclusión de que la modificación de alguna(s) cisteína(s) no esenciales protege a la cisteína esencial frente a la inactivación por un compuesto tan reactivo como el MMTS.

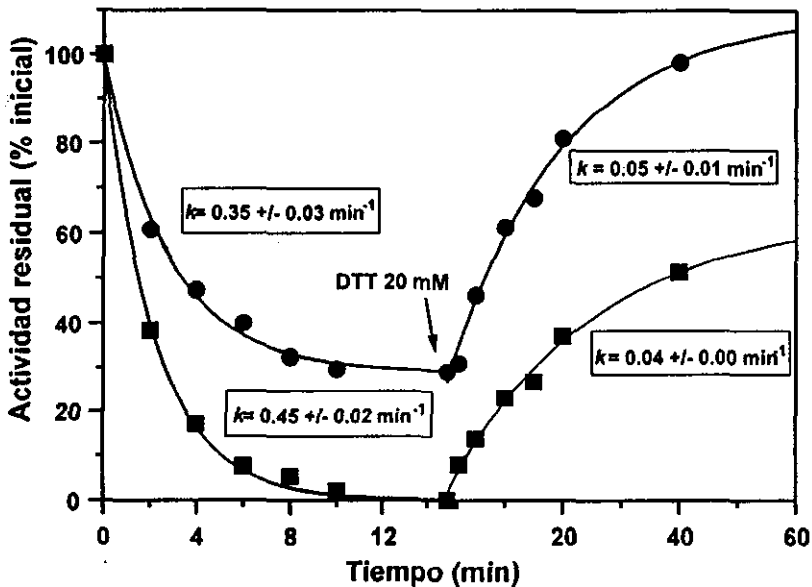


Figura 18. Modificación secuencial de BADH por oxidación por el O₂ ambiental y por MMTS. La enzima (1.86 μM) se expuso al O₂ ambiental en ausencia de agentes reductores en ausencia (■) o en presencia de BA 10 mM + NADP⁺ 5 mM (●) bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos para la modificación de los grupos sulfhidrilo, es decir en ausencia de compuestos reductores. Después de un periodo de 35 min la enzima fue filtrada a través de una columna de Sephadex G-25 para eliminar los sustratos y productos del medio de incubación. Posteriormente, la enzima fue tratada con MMTS 5 μM durante 15 min y después se le agregó DTT 20 mM para revertir el efecto del MMTS. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir la actividad residual de la BADH. Las líneas son teóricas y son los mejores ajustes de los datos experimentales a la ecuación 1, o a la ecuación 2, para los datos de la enzima preincubada en presencia de ambos sustratos.

VIII. DISCUSIÓN

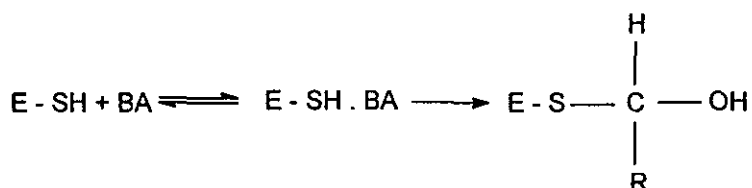
VIII. 1 MODIFICACIÓN DE LA BADH POR REACTIVOS PARA MONOTIOLES

Diferentes investigadores han utilizado varias estrategias experimentales para tratar de probar que la cisteína es el nucleófilo del sitio activo de las aldehído deshidrogenasas. Una de estas estrategias, la modificación química, ha sido la elegida en este trabajo para investigar el papel de las cisteínas en la BADH de *P. aeruginosa*.

La inactivación de esta enzima por NEM y MMTS y la protección que ofrecen los sustratos y productos de la enzima frente a esta inactivación sugiere que existe al menos una cisteína esencial para la actividad enzimática localizada en el sitio activo.

La pérdida total de actividad causada por una baja concentración de MMTS y su completa reversión por DTT eliminan la posibilidad de que un reactivo muy voluminoso como NEM esté ocasionando la pérdida de actividad haciendo al sitio activo de la enzima inaccesible al sustrato. Estos resultados apoyan la idea de que la integridad química del (los) grupo(s) -SH reactivo(s) es un requisito para la actividad funcional de la BADH. Por tanto, al igual que las otras aldehído deshidrogenasas estudiadas hasta la fecha como las de hígado humano, de hígado de caballo, de hígado de oveja y de hígado de rata (Hempel *et al.*, 1982, 1991, 1993; Von Bahr-Lindström *et al.*, 1985; Tu and Weiner, 1988; Kitson *et al.*, 1991; Blatter *et al.*, 1992; Hill *et al.*, 1994; Wang and Weiner, 1995; Farrés *et al.*, 1995) la BADH de *P. aeruginosa* posee al menos una cisteína esencial muy reactiva frente a agentes específicos para monotioles. Esta cisteína debe ser la que esté absolutamente conservada en todas las aldehído deshidrogenasas y que en el caso de la BADH de *P. aeruginosa* corresponde a la Cys286, deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de la BADH proporcionada por el Dr. Richard L. Garber, Director de la Research Collaborations. Pathogenesis Corporation, que pertenece al grupo de investigadores que trabajan en el "Pseudomonas Genome Project".

La protección ejercida por el dinucleótido frente a la inactivación por modificación con reactivos para monotioles es sólo parcial, lo que indica que la coenzima no interacciona directamente con el residuo de cisteína esencial. La unión de la coenzima al sitio activo o bien disminuye la accesibilidad de la cisteína esencial a los agentes modificantes, o bien produce un cambio conformacional que disminuye su reactividad. En cambio, la protección ejercida por la betaína aldehído es total, lo que indica, en congruencia con el mecanismo químico propuesto para las aldehído deshidrogenasas (Hempel *et al.*, 1982, 1991, 1993; Von Bahr-Lindström *et al.*, 1985; Tu and Weiner, 1988; Kitson *et al.*, 1991; Blatter *et al.*, 1992; Wang and Weiner, 1995; Farrés *et al.*, 1995), que la cisteína esencial interacciona directamente con el sustrato aldehído. La interacción de betaína aldehído con la enzima probablemente ocurra en dos pasos, de acuerdo al siguiente esquema :



En el primer paso la betaína aldehído se uniría en forma reversible a la enzima por enlaces débiles no covalentes y en el segundo ocurriría la reacción entre el ión tiolato del residuo de cisteína esencial y la betaína aldehído, formándose el derivado tiohemiacetal de la enzima, intermediario de la reacción. No tenemos datos que nos permitan discernir si ambos pasos se dan en la reacción de la enzima libre con la betaína aldehído, o sólo se darían cuando la betaína aldehído se une al complejo $E \cdot \text{NAD(P)}^+$. Por ello no podemos saber si la constante de disociación determinada es una constante sencilla que corresponde sólo a uno de los pasos, o es una constante compleja que involucra a las constantes de los dos pasos postulados.

La protección ejercida tanto por el dinucleótido como por la betaína aldehído frente a la inactivación demuestra que ambos sustratos son capaces de unirse a la enzima libre, lo

que sugiere un mecanismo cinético al azar para la reacción catalizada por esta enzima. Sin embargo, el valor de la constante de disociación del complejo $E \cdot BA$, 1.2 mM, determinado por medio de la dependencia de la velocidad de inactivación de la concentración de betaína aldehído, es muy superior a los valores de K_i y K_m para este sustrato determinados en estudios de velocidad inicial al mismo pH y temperatura, 8 y 30°C (Velasco *et al.*, 1999 manuscrito sometido). Esta discrepancia podría deberse a dos posibles causas: El mecanismo cinético al azar de la enzima no es de equilibrio rápido, sino de estado estacionario, por lo que las K_{iBA} no es la constante de disociación del complejo $E \cdot BA$. O bien, el complejo $E \cdot BA$ no es productivo, sino que es un complejo "sin salida" y el mecanismo cinético de la enzima es realmente ordenado uniéndose primero con el dinucleótido uniéndose primero. Se requieren estudios cinéticos detallados para comprobar cuál de estas dos posibilidades es la que ocurre.

Un resultado interesante e inesperado de este estudio es que la modificación química en presencia de alguno de los sustratos no sólo retarda el proceso de inactivación sino que además evita la inactivación total. Esta observación se hizo tanto con NEM como con MMTS. Puesto que el enlace formado entre un residuo de cisteína y la NEM no puede ser roto por otro tiol, la actividad residual de la enzima no puede ser el resultado del intercambio de disulfuro con otra cisteína no esencial que en presencia de los sustratos quedara próxima a la esencial a consecuencia del cambio conformacional que la unión de estos ligandos propablemente conlleva. Aún cuando este intercambio si puede ocurrir en el caso de la modificación por MMTS, se llegaría finalmente a una inactivación total de la enzima debido a que la reacción se está llevando a cabo en presencia de un exceso molar de este reactivo. Por tanto, los resultados de la modificación en presencia de alguno de los sustratos parecen indicar que bajo estas condiciones una cisteína no esencial se está modificando en forma simultánea a la esencial, si bien en una reacción más lenta, y que una vez modificada impide la modificación de la esencial.

Esta conclusión se refuerza por los resultados obtenidos en los experimentos de doble modificación, los cuales además confirman que la modificación de esa cisteína no

esencial, "protectora de la esencial", ocurre sólo en presencia de los sustratos. La naturaleza de la modificación que sufre esa(s) cisteína(s) no parece determinar el que pueda o no actuar posteriormente en la protección de la cisteína esencial, puesto que modificaciones tan dispares como las producidas por NEM, por MMTS o por oxidación por el oxígeno ambiental producen los mismos efectos. La NEM introduce en forma irreversible un grupo muy voluminoso en la proteína. El MMTS introduce un grupo mucho más pequeño y que puede ser eliminado por un intercambio de disulfuros con otro tiol de potencial redox adecuado. La oxidación por el oxígeno ambiental produce la formación de puentes disulfuro. Parece por tanto, que cualquiera que sea esta modificación se induce un cambio conformacional que vuelve a la cisteína esencial inaccesible al MMTS si no hay sustratos presentes. Sin embargo, la cisteína esencial sigue participando en la reacción como un agente nucleófilo, y por tanto es accesible a la betaína aldehído. Pudiera ser por tanto que el cambio conformacional inducido por los sustratos la haga accesible a la betaína aldehído, y probablemente al MMTS de no estar protegida por ellos.

Es interesante que el porcentaje de actividad residual no fue el mismo en todos los experimentos, sino que varía del 18 al 30% de la actividad inicial. Esto descarta la posibilidad de que se esté produciendo una enzima totalmente modificada pero parcialmente activa, puesto que ello llevaría a una actividad residual que sería la propia de la enzima parcialmente activa y por ello constante. Además, de ser cierta esta última posibilidad, ello implicaría un cambio cualitativo muy importante en el mecanismo de la reacción catalizada como consecuencia de la modificación de cierta(s) cisteína(s), ya que la enzima modificada no requeriría de una cisteína para llevar a cabo la catálisis. Podría ser otro residuo de aminoácido el que realizara el ataque nucleofílico, o la enzima podría usar como sustrato al hidrato de la betaína aldehído, obviándose así la necesidad de un nucleófilo, como se encontró en estudios realizados con la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa de *E. coli*, en la cual una mutación del residuo nucleofílico (Cys149) del sitio activo produjo una enzima que usa al hidrato de aldehído como su verdadero sustrato, en lugar de la forma aldehído (Corbier *et al.*, 1992). Sin embargo, los conocimientos

actuales sobre los mecanismos de reacción de las aldehído deshidrogenasas permiten calificar como poco probable esta posibilidad.

Las diferencias cuantitativas encontradas entre los diferentes tratamientos parecen estar relacionadas con el periodo de tiempo al que la enzima activa está sometida al agente modificador en presencia de los sustratos. Así en presencia de la betaína aldehído se obtienen actividades residuales más altas que en presencia de NADP⁺, y en presencia de ambos sustratos son aún más altas que cuando sólo uno de ellos está presente. Más aún, cuando la modificación en presencia de ambos sustratos se alargó de 10 a 35 min, la actividad residual se incrementó del 18 al 30% (comparar resultados del las Figs. 17 y 18).

Se puede especular que este papel protector de una cisteína sobre la esencial tenga relevancia fisiológica y permita a la enzima *in vivo* protegerse frente a inactivación bajo condiciones oxidantes si están los sustratos presentes, al menos durante el periodo inicial en el que se establecen estas condiciones adversas.

VIII. 2 MODIFICACIÓN DE LA BADH POR REACTIVOS PARA DITIOLES

La inactivación de la enzima por reactivos como Cu(OP)₂ y As-BAL demuestra la existencia de al menos una pareja de cisteínas vecinales. Una de las cisteínas de la pareja parece ser la esencial, puesto que los sustratos protegen totalmente frente a esta inactivación, aunque no se puede descartar la posibilidad de que la protección sea el resultado de un cambio conformacional inducido por la unión de los sustratos.

Este tipo de cisteínas vecinales podría jugar un importante papel en la regulación de la actividad de la enzima si su oxidación a puente disulfuro conlleva inactivación y esta inactivación se revierte por reducción del puente disulfuro. Este es un mecanismo de regulación en numerosas enzimas (Gilbert, 1982) y ha sido estudiado con detalle sobre todo en enzimas fotosintéticas. La regulación por intercambio tiol/disulfuro puede estar mediada por los disulfuros biológicos como CoASSCoA o GSSG (Gilbert and Stewart, 1981;

Creighton, 1984) o por tiorredoxina oxidada (Holmgren, 1984). Nuestro hallazgo de que la inactivación de la BADH por formación de un puente disulfuro no es reversible por incubación con DTT, indica que la forma oxidada de la enzima es altamente inestable y, por tanto, descarta la posible regulación de la actividad de BADH por un mecanismo de intercambio tiol/disulfuro.

La enzima modificada con As-BAL sí es en cambio bastante estable, lo que muy probablemente se debe a la diferente geometría del enlace involucrado en esta última modificación, que no es un disulfuro sino un ditioarsenito (Fluharty and Sanadi, 1961). La reversibilidad de la reacción con As-BAL indica, sin embargo, que el ditioarsenito que la enzima forma con el As-BAL no es muy estable. En conjunto, los resultados de modificación con Cu(OP)_2 y As-BAL sugieren que el par de cisteínas vecinales no están a la distancia o en la orientación adecuada para reaccionar entre sí.

Los resultados del experimento de doble modificación, primero con NEM en presencia de los sustratos y luego con As-BAL en su ausencia, claramente demuestran que de las dos cisteínas vecinales sólo una de ellas es la esencial. Además este experimento sugiere que la unión de los sustratos aleja a la segunda cisteína de la esencial de manera que no es protegida por ellos y puede ser modificada totalmente por NEM, impidiéndose así la formación del ditioarsenito en la posterior incubación con As-BAL. Es de notar que en presencia de los sustratos esta segunda cisteína se modifica totalmente durante el periodo de incubación con NEM (10 min), mientras que no se modifica en ningún grado en ausencia de los sustratos bajo condiciones de reacción idénticas.

Este resultado también muestra que: 1) el As-BAL reacciona con dos tioles que pertenecen a la misma molécula y no con ditioles de dos moléculas diferentes y 2) el As-BAL está reaccionando con dos tioles vecinales de acuerdo al modelo propuesto por Fluharty and Sanadi (1961) y no con un sólo tiol. De estar reaccionando sólo con un tiol, lo estaría haciendo con el esencial y éste está protegido durante la modificación con NEM en

presencia de sustratos, por lo que estaría disponible para su posterior modificación por As-BAL y la enzima debería inactivarse.

Finalmente, se podría sugerir que la incapacidad del As-BAL de inactivar a la enzima previamente tratada en presencia de los sustratos con NEM pudiera deberse a la modificación de la cisteína que protege a la esencial frente a modificación por MMTS. Sin embargo, no creemos que éste sea el caso, dado que la protección ejercida frente a la modificación por As-BAL es total, mientras que es parcial la ejercida frente a MMTS. Ello sugiere que son dos las cisteínas no esenciales modificadas en presencia de los sustratos. Una, la que forma pareja con la vecinal, que se modifica totalmente durante el tiempo de la preincubación en presencia de NEM y de los sustratos y que, por tanto, hace que la enzima ya no sea modificable por As-BAL. Otra, que protege a la cisteína esencial frente a una modificación posterior con un reactivo específico para monotoles, pero que sería de menor reactividad, por lo que no se modificaría el 100% de la proteína durante la preincubación, ofreciendo así protección sólo en aquellas moléculas que hayan sido modificadas, lo que se observa como una protección parcial. Es claro que se necesita probar esta hipótesis con experimentos adicionales.

IX. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, las conclusiones de este trabajo son:

- 1) La enzima BADH de *P. aeruginosa* posee al menos un residuo de cisteína esencial para su actividad.
- 2) La cisteína esencial forma parte de una pareja de cisteínas vecinales.
- 3) No es probable que la actividad de esta enzima se regule *in vivo* por un mecanismo de intercambio tiol/disulfuro.
- 4) Existe una tercera cisteína, no esencial, modificable sólo en presencia de los sustratos, que al ser modificada evita la posterior modificación de la cisteína esencial.

X. PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha dado un primer paso en el estudio de la identificación de residuos de aminoácidos esenciales de la BADH de *P. aeruginosa* al detectar la presencia de un residuo de cisteína esencial. Además, se ha avanzado en la caracterización y en la elucidación del posible papel de otras cisteínas de esta importante enzima. Sin embargo, queda mucho aún por investigar a este respecto para confirmar y ampliar conclusiones preliminares y para probar o rechazar hipótesis surgidas de los resultados aquí mostrados.

Como punto importante resta determinar la estequiometría de la reacción de inactivación por reactivos modificadores de monotioles y ditioles, así como la localización de la cisteína esencial en la estructura primaria de la enzima. Esto último permitirá la utilización de mutagénesis sitio dirigida para la construcción de enzimas mutadas en dicha posición y así confirmar o no la participación directa de este residuo de aminoácido en la catálisis. Resulta también muy interesante el identificar a la cisteína "protectora" de la esencial y confirmar su función por medio de mutagénesis sitio dirigida y la expresión del gen mutado en bacterias. A este respecto, es fundamental caracterizar cinéticamente a la enzima modificada en las cisteínas no esenciales y comprobar si el mecanismo cinético y/o el mecanismo de reacción se han visto afectados.

Si consideramos que la BADH de bacterias tiene una alta homología con las aldehído deshidrogenasas de hígado de mamífero (Boyd *et al.*, 1991; Lamarck *et al.*, 1991), podríamos suponer que los agentes terapéuticos que se utilizan para inhibir estas últimas tendrían efectos similares sobre las bacterias. Por lo que sería importante realizar estudios para observar el efecto de compuestos que modifican cisteínas como el disulfiram o sus metabolitos en la BADH de *P. aeruginosa*, ya que en el caso de que ésta resultara inhibida por estos compuestos, podría pensarse en una nueva forma para controlar la infección que la bacteria causa en los sitios que son ricos en algunos de los compuestos de los precursores de la betaína.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abriola, D. P., MacKerell, A. D. and Pietruszko, R. (1990). Correlation of loss of activity of human aldehyde dehydrogenase with reaction of bromoacetophenone with glutamic acid-268 and cysteine-302 residues. Partial-sites reactivity of aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* **266**: 179-187.
- Ambroziak, W. and Pietruszko, R. (1991). Human aldehyde dehydrogenase: activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* **266**: 13011-13018.
- Arakawa, K., Katayama, M. and Takabe, T. (1987). Immunological studies of betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol.* **31**: 797-803.
- Bagui, T. K., Gosh, M. and Datta, A. K. (1996). Two conformationally vicinal thiols at the active site of *Leishmania donovani* adenosine kinase. *Biochem. J.* **316**: 439-445.
- Bergen, G. A. And Shelhamer, J. H. (1996). Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **10**: 297-325.
- Bernard, T., Pocard, J-A, Perroud, B. and Le Rudulier, D. (1986). Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch. Microbiol.* **143**: 359-364.
- Biggers, J. D.; Lawitts, J. A. and Lechene, C. P. (1993). The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **34**: 380-390.
- Blatter, E., Abriola, D. and Pietruszko, R. (1992). Aldehyde dehydrogenase. Covalent intermediate in aldehyde dehydrogenation and ester hydrolysis. *Biochem. J.* **282**: 353-360.
- Boch, J., Kempf, S. and Bremer, E. (1996). Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.* **178**: 5121-5129.
- Boch, J., Nau-Wagner G., Kneip, S. and Bremer, E. (1997). Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* **168**: 282-289.
- Boyd, L. A., Adam, L. Pelcher, L. E. McHughen, A., Hirji, R. and Selvaraj, G. (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.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Chambers, T. S. and Kunin, M. C. (1987). Isolation of glycine betaine and proline betaine from human urine. Assessment of their role as osmoprotective agents for bacteria and the kidney. *J. Clin. Invest.* **79**: 731-737.

Chern, M. K. and Pietruszko, R. (1995). Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**: 561-568.

Corbier, C. Della Seta, F. and Branlant, G. (1992). A new chemical mechanism catalyzed by a mutated aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **31**: 12532-12535.

Creighton, T. E. (1984). Disulfide bond formation in proteins. *Methods in Enzymology*. Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N. (eds), Academic Press, New York, Vol 107, pages 305-329.

Csonka, L. N. and Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.

Deretic, V., Govan, J. R., Konyecsni, W. M. and Martin, D. W. (1990). Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis: mutations in the *muc* loci affect transcription of the *algR* and *algD* genes in response to environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* **4**: 189-196.

Domenech, E. C. Garrido, N. M. and Lisa, A. T. (1991). *Pseudomonas aeruginosa* cholinesterase and phosphorylcholine phosphatase: two enzymes contributing to corneal infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**: 131-136.

Dragolovich, J., and Pierce, S. K. (1994). Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *J. Exp. Zool.* **270**: 417-425.

D'Souza-Ault, M. R., Smith, L. T. and Smith, G. M. (1993). Roles of *N*-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 473-478.

Du Vigneaud V., Simmonds, S., Chandler, J. P. and Cohn, M. (1946). A further investigation of the role of betaine in transmethylation reactions *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **165**: 639-648.

Eshoo, M. W. (1988). *lac* fusion analysis of the *bet* genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. *J. Bacteriol.* **170**: 5208-5215.

Falkenberg, P. and Strom, R. A. (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**: 253-259.

Farrés, J., Wang, T., Cunningham, J. and Weiner, H. (1995). Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**: 2592-2598.

Fluharty, A. L. and Sanadi, D. R. (1961). On the mechanism of oxidative phosphorylation. II. Effects of arsenite alone and in combination with 2,3-dimercaptopropanol. *J. Biol. Chem.* **236**: 2772-2778.

Gamboa, A., Valenzuela, E. M. and Murillo, E. (1991). Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Plant Physiol.* **137**: 586-590.

Geddes, A. M. (1980). Other infections. En.: Sabath, L. D. (de.), *Pseudomonas aeruginosa*: the organism, diseases it causes and their treatment. Hans Huber. Bern Stuttgart Vienna. pags. 89-100.

Gilbert, H. F. and Stewart, M. D. (1981). Inactivation of hydroxymethylglutaryl-CoA reductase from yeast by Coenzyme A disulfide. *J. Biol. Chem.* **256**: 1782-1785.

Gilbert, H. F. (1982). Biological disulfides: the third messenger?. Modulation of phosphofructokinase activity by thiol/disulfide exchange. *J. Biol. Chem.* **257**: 12086-12091.

Govan, J. R. W. and Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**: 539-574.

Graham, W. D. (1951). In vitro inhibition of liver aldehyde dehydrogenase by tetraethylthiuram disulphide. *J. Pharm. Pharmacol.* **3**: 160-168.

Guzmán-Partida, A. M. and Valenzuela-Soto, E. M. (1998). Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **119**: 485-491.

Hald, J. Jacobsen, E. and Larsen, V. (1948). The sensitizing effect of tetraethylthiuramdisulphide (Antabuse) to ethylalcohol. *Acta Pharmacol.* **4**: 285-296.

Hempel, J. and Pietruszko, R. (1981). Selective chemical modification of human liver aldehyde dehydrogenases E_1 and E_2 by iodoacetamide. *J. Biol. Chem.* **256**: 10889-10896.

Hempel, J., Pietruszko, R., Fietzek, P. and Jörnvall, H. (1982). Identification of a segment containing a reactive cysteine residue in human liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase (isoenzyme E_1). *Biochemistry* **21**: 6834-6838.

Hempel, J., Nicholas, H. and Jörnvall, H. (1991). Thiol proteases and aldehyde dehydrogenases: evolution from a common thiolesterase precursor? *Proteins Struct. Funct. Genet.* **11**: 176-183.

Hempel, J., Nicholas, H. and Lindahl, R. (1993). Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci.* **2**: 1890-1900.

Hill, J. P., Motion, R. L., Buckley, P. D. and Blackwell, L. F. (1994). The effect of *p*-(chloromercuri)benzoate modification of cytosolic aldehyde dehydrogenase from sheep liver. Evidence for a second aldehyde binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**: 256-263.

Holmgren, A. (1984). Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin. In *Methods in Enzymology*. Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N. (eds), Academic Press, New York, Vol 107, pages 295-304.

Iglesias, A. A., Serrano, A., Guerrero, M. G. and Losada, M. (1987). Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **925**: 1-10.

Iglesias, A. A. and Losada, M. (1988). Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 830-840.

Imhoff, J. F. and Rodríguez-Valera (1984). Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol.* **160**: 478-479.

Imoto, T. and Yamada, H. (1989). Chemical modification. En: Creighton T. E. *Protein function. A practical approach*. Oirl Press IRL Press Oxford University Press. pages 247-277.

Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S. Y. and Takabe, T. (1995). Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* **27**: 307-315.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H. and Eklund, H. (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* **7**: 2106-2117.

Kilbourn, J. P. (1978). Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* **i**: 334.

Kitson, T., Hill, J. and Midwinter, G. (1991). Identification of a catalytically essential nucleophilic residue in sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* **275**: 207-210.

- Kobashi, K. (1968). Catalytic oxidation of sulfhydryl groups by *o*-phenantroline copper complex. *Biochim. Biophys. Acta* **158**: 239-245.
- Kurys, G., Ambroziak, W. and Pietruszko, R. (1989). Human aldehyde dehydrogenase. Purification and characterization of a third isozyme with low K_m for γ -aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* **264**: 4715-4721.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lam, J. P., Mays, D. C. and Lipsky, J. J. (1997). Inhibition of recombinant human mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases by two candidates for the active metabolites of disulfiram. *Biochemistry* **36**: 13748-13754.
- Lamark, T. Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J. and Strom, A. R. (1991). DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 1049-1064.
- Landfald, B. and Strom, A. R. (1986). Choline-Glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 849-855.
- Legaria, J., Rajsbaum, R., Muñoz-Clares, R. A., Villegas-Sepúlveda, N., Simpson, J. and Iturriaga, G. (1998). Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene* **218**: 69-76.
- Le Rudulier and D. Valentine, R. C. (1982). Genetic engineering in agriculture: osmoregulation. *TIBS* **7**: 431-433.
- Le Rudulier, D. and Bouillard, L. (1983). Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae*: enhancement of anaerobic growth and nitrogen fixation under stress by proline betaine, γ -butyrobetaine, and other related compounds. *Can. J. Microbiol.* **30**: 299-305.
- Le Rudulier, D., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T. and Valentine, R. C. (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.
- Levy, H. M., Leber, P. D. and Ryan, E. M. (1963). Inactivation of myosin by 2,4-dinitrophenol and protection by adenosine triphosphate and other phosphate compounds. *J. Biol. Chem.* **238**: 3654-3659.
- Lisa, A. T., Casale, H. C. and Domenech, E. C. (1994). Cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high phosphate medium. *Curr. Microbiol.* **28**: 71-76.

- Liu, Zhi-Jie, Sun, Yuh-Ju, Rose, John, Chung, Yong-Je, Hsiao, Chwan-Deng, Chang, Wen-Rui, Kuo, Ingrid, Perozich, John., Lindahl, Ronald, Hempel, John. and Wang, Bi-Cheng. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struc. Biol.* 4: 317-326.
- MacKerell, A. D., Vallari, R. C. and Pietruszko, R. (1985). Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase inhibition by diethylthiocarbamic acid methanethiol mixed disulfide: a derivative of disulfiram. *FEBS* 179: 77-81.
- Mays, D. C., Nelson, A. N., Fauq, A. H., Shriver, Z. H., Veverka, K. A., Naylor, S. and Lipsky, J. (1995). *S*-methyl *N*, *N*-diethylthiocarbamate sulfone, a potential metabolite of disulfiram and potent inhibitor of low K_m mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 49: 693-700.
- McCue, K. and Hanson, A. D. (1992). Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* 18: 1-11.
- Metzler, D. E. (1997) Biochemistry. The chemical reactions of living cells. International Edition. Academic Press. pags. 471-472.
- Miller, J. H. (1977). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Laboratory, New York.
- Modrak, D., Wu, L., Alberta, J. and Fisher, R. (1988). Conformational features of bovine heart mitochondrial transhydrogenase. *Biochemistry* 22: 7665-7671.
- Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y. and Yamada, H. (1980). Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpon didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* 40: 3015-3016.
- Mori, N., Yoshida N. and Kitamoto, Y. (1992). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferment. Bioeng.* 73: 352-356.
- Mukerjee, N. and Pietruszko, R. (1994). Inactivation of human aldehyde dehydrogenase by isosorbide dinitrate. *J. Biol. Chem.* 269: 21664-21669.
- Muñoz-Clares, R. A., Vojtechová, M., Mújica-Jiménez, C. and Rodríguez-Sotres, R. (1997). Effects of glycerol on the kinetic properties of betaine aldehyde dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 6: 261-268.
- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y. and Ogata, K. (1975). Choline dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric. Biol. Chem.* 39: 1513-1514.

Nagasawa, T., Kawabata, Y., Yani, Y. and Ogata, K. (1976). Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 1743-1749.

Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K. and Takabe, T. (1997). Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* **11**: 1115-1120.

Pan, S-M., Moreau, R. A., Yu, C. and Huang, A. H. (1981). Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. *Plant Physiol.* **67**: 1105-1108.

Penefsky, H. S. (1977). Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* **252**: 2891-2899.

Pepsin, S. R. and Candia, O. A. (1982). Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **22**: 651-629.

Petronini, PGM., de Angelis, E., Borghetti, P., Borghetti, AF. and Wheelers, KP. (1992). Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochem. J.* **282**: 69-73.

Pier, B. G. (1985). Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* **151**: 575-580.

Pietruszko, R., Kikonyogo, A., Chern, M. K. and Izaguirre, G. (1997). Human aldehyde dehydrogenase E3. Further characterization. *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**: 243-252.

Pocard, J. A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M. C. and Le Rudulier, D. (1997). Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology* **143**: 1369-1379.

Pruitt, B. A. (1980). Infections of burns other wounds caused by *Pseudomonas aeruginosa*. En: Sabath, L. D. (de.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Stuttgart Vienna, pags. 55-70.

Rennick, B. R. (1981). Renal tubule transport of organic ions. *Am. J. Physiol.* **240**: F83-F89.

Reynolds, H. Y. and Fick, R. N. (1980). *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections, (emphasizing nosocomial pneumonia and respirator infections in cystic fibrosis). En: Sabath, L. D. (de.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber: Bern Sttutart Vienna, pags. 71-88.

Rhodes, D. and Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384.

Riordan, J. F. and Vallee, B. L. (1972). Reactions with *N*-Ethylmaleimide and *p*-Mercuribenzoate. In *Methods in Enzymology*. Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N. (eds), Academic Press, New York, Vol 25, pages 449-456.

Rivett, A. J., and Tipton, K. F. (1981). Kinetic studies with rat-brain succinic-semialdehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **117**: 187-193.

Rusell, R. and Scopes, R. K. (1994). Use of hydrophobic chromatography for purification of the membrane-located choline dehydrogenase from a *Pseudomonas* strain. *Bioseparation* **4**: 279-284.

Ryzewski, C. N. and Pietruszko, R. (1980). Kinetic mechanism of horse liver alcohol dehydrogenase SS. *Biochemistry* **19**: 4843-4848.

Sage, A. E., Vasil, A. I. and Vasil, M. L. (1997). Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol. Microbiol.* **23**: 43-56.

Salvano, M. A., Lisa, A. T. and Domenech, E. C. (1989). Choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Cell. Biochem.* **85**: 81-89.

Seymour, C. A. (1984). Bringing molecular biology to the bedside: cystic fibrosis. *Bioessays* **1**: 38-40.

Shortridge, V. D., Lazdunski, A. and Vasil, M. L. (1992). Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **6**: 863-871.

Skorey, K., Ly, H. D., Kelly, J., Hammond, M., Ramachandran, C., Huang, Z., Gresser, M. J. and Wang, Q. (1997). How does alendronate inhibit protein-tyrosine phosphatases?. *J. Biol. Chem.* **272**: 22472-22480.

Smith, D. J., Maggio, E. T. and Lenyon, G. L. (1975). Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry* **14**: 766-771.

Smith, T. L., Pocard, A. J., Bernard, T. and Le Rudulier, D. (1988). Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **170**: 3142-3149.

Somero, G. N. (1986). Protons, osmolytes, and fitness of internal milieu for protein function. *Am. J. Physiol.* **251**: R197-R213.

- Storey, R. and Win Jones, R. G. (1977). Quaternary ammonium compounds in plants in relation to salt resistance. *Phytochemistry* 16: 447-453.
- Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. and Hurley, T. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: The genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5: 701-711.
- Stocken, L. A. (1947). 2: 3-Dimercaptopropanol ("British Anti-Lewisite") and related compounds. *J. Chem. Soc.:* 592-595.
- Styrvold, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B. Eshoo, M. W., Bjornsen, T. and Strom, A. R. (1986). Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J. Bacteriol.* 165: 856-863.
- Teng, H., Segura, E. and Grubmeyer, C. (1993). Conserved cysteine residues of histidinol dehydrogenase are not involved in catalysis. Novel chemistry required for enzymatic aldehyde oxidation. *J. Biol. Chem.* 268: 14182-14188.
- Trossat, C., Nolte, K. D. and Hanson, A. D. (1996). Evidence that the pathway of dimethylsulfoniopropionate biosynthesis begins in the cytosol and ends in the chloroplast. *Plant. Physiol.* 111: 965-973.
- Trossat, C., Rathinasabapathi, B. and Hanson, A. D. (1997). Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and ω -aminoaldehydes. *Plant Physiol.* 113: 1457-1461.
- Tu, G. C. and Weiner, H. (1988a). Identification of the cysteine residue in the active site of horse liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 263: 1212-1217.
- Tu, G. C. and Weiner, H. (1988b). Evidence for two distinct active sites on aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 263: 1218-1222.
- Vaca, P. S. y Cervantes, V. C. (1988). Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 30: 87-90.
- Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A. (1993). Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso ordered Bi Bi steady state mechanism. *J. Biol. Chem.* 268: 23818-23824.
- Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A. (1994). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* 143: 145-152.
- Vallari, C. R. and Pietruszko, R. (1982). Human Aldehyde Dehydrogenase: Mechanism of inhibition by disulfiram. *Science* 216: 637-639.

- Vedadi, M., Szittner, R., Smillie, L. and Meighen, E. (1995). Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP⁺-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* **34**: 16725-16732.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. and Muñoz-Clares, R. A. (1999). Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**: 1292-1300.
- Velasco-García, R., González-Segura, L. and Muñoz-Clares, R. A. (1999b). Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Kinetics of the NADP⁺- and NAD⁺- dependent reactions. Manuscrito sometido a *Biochemistry*
- Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R., Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A. (1997a). Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biochim. Biophys. Acta* **1341**: 49-57.
- Vojtechová, M., Hanson, A. D. and Muñoz-Clares, R. A. (1997b). Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD - dependent oxidation of dimethylsulfoniopropinaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**: 81-88.
- Von Bahr-Lindström, H., Jeck, R., Woenckhaus, C., Sohn, S., Hempel, J., and Jörnvall, H. (1985). Characterization of the coenzyme binding site of liver aldehyde dehydrogenase: differential reactivity of coenzyme analogues. *Biochemistry* **24**: 5847-5851.
- Wang, X. and Weiner, H. (1995). Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**: 237-243.
- Warr, S. R. C., Reed, R. H. and Stewart, W. D. P. (1988). The compatibility of osmotica in cyanobacteria. *Plant Cell. Environ.* **11**: 137-142.
- Weiner, H., Farrés, J., Rout, U. J., Wang, X. and Zheng, C. (1995). Site directed mutagenesis to probe for active site components of liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Adv. Exp. Med. Biol.* **5**:1-7.
- Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D. (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. and Hanson, A. D. (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.

- Wilken, D. R., McMacken, M. L. and Rodríguez, A. (1970). Choline and betaine aldehyde oxidation by rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **216**: 305-317.
- Wolff, A., MacGregor, C. H. Eisenberg, R. C. and Phibbs, P. V. (1991). Isolation and characterization of catabolite repression control mutants of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *J. Bacteriol.* **173**: 4700-4706.
- Wood, A. J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R. J. and Goldsbrough P. B. (1996). Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. Molecular cloning and expression of two related genes. *Plant Physiol.* **110**: 1301-1308.
- Wright, J. R. and Clements, J. A. (1987). Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**: 426-444.
- Wyn Jones, R.G. and Storey, R. (1981). Betaines. En *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. ed. L. G. Paleg, D. Aspinall. Sydney: Academic. pags 171-204.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. and Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.
- Zheng, C. F. and Weiner, H. (1993). Role of the highly conserved histidine residues in rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase as studied by site directed mutagenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **305**: 460-466.