

51



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

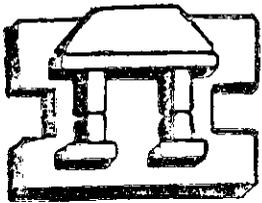
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

EFFECTO DE CATIONES MONOVALENTES SOBRE LA
ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA BETAINA ALDEHIDO
DESHIDROGENASA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LLARAI CAROLINA GAVIRIA GONZALEZ

2001

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO VELASCO GARCIA



IZTACALA

TLALNEPANTLA, EDO. MEX.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Los miembros de la comisión dictaminadora de esta tesis fueron:

Presidente: Dr. Sergio González Moreno.

Vocal: Dr. Roberto Velasco García.

Secretario: Biol. Hugo V. Perales Vela.

Suplente: Biol. Josefina Vázquez Medrano.

Suplente: Dr. Ignacio Peñalosa Castro.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Osmorregulación de la Unidad de Morfología y función, de la *FES* Iztacala, bajo la dirección del Dr. Roberto Velasco García.

Los experimentos de fluorescencia se realizaron en el laboratorio de Bioquímica de la misma unidad y los de dispersión dinámica de luz en el Instituto de Química.

Durante este trabajo se recibió apoyo del programa de becas de tesis de licenciatura (PROBETEL).

Tenía la frente exageradamente amplia, quedaba en su rostro un sello inconfundible de hombre bien nacido. Durante algunos momentos permaneció frente a mí, [...]. Súbitamente lanzó una estertórea carcajada y arrimando su rostro muy junto al mío, me dijo despacito: al fin te volví a encontrar.....
Fragmento de Orocué (1957), de R. H. G.

ESTE TRABAJO ESTA DEDICADO A:

RAFAEL H. GAVIRIA NEYRA.

AGRADECIMIENTOS.

A cada uno de los revisores de esta tesis por las aportaciones realizadas a este trabajo.

Al Dr. Sergio González Moreno, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo los experimentos de fluorescencia.

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, por los comentarios hechos para mejorar esta tesis.

A la Dra. Alejandra Hernández Santoyo por su ayuda para obtener los datos del análisis de dispersión dinámica de luz.

A Lilian por su invaluable ayuda y a la Mtra. Rocío por las palabras precisas en el momento justo.

A Roberto por todo lo que he aprendido y por la oportunidad que me ha dado de estar en un laboratorio donde solo hay gente excelente.

A mi familia. A mi mamá por sus esfuerzos en comprender mis decisiones y por todo lo que me da y a mis hermanos por su fuerza.

A mi otra familia Juan y Judith.

A Alex por su amistad y su ayuda, lo mismo que a Luz, Evita, Xochitl, Oralia y por supuesto Andrés.

A la UNAM y a los profesores buenos que tuve.

A On site y a VIDESA por ayudarme a decidir lo que no quiero ser.

INDÍCE

INTRODUCCION.....	1
LAS ENZIMAS.....	1
DESNATURALIZACION DE PROTEÍNAS.....	3
ESTABILIDAD.....	4
Hidrofobicidad.....	5
Empaquetamiento.....	5
Puentes de sal y puentes de hidrógeno.....	6
Flexibilidad.....	6
Substitución de aminoácidos.....	6
FACTORES EXTRÍNSECOS Y ESTABILIDAD PROTEÍCA.....	7
ENZIMAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS.....	9
ANTECEDENTES.....	12
REQUERIMIENTO DE IONES INORGÁNICOS PARA LA ACTIVACIÓN DE ALDHs	12
OBJETIVOS.....	13
METODOLOGÍA.....	14
CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	14
PURIFICACIÓN DE LA BADH.....	14
GELES.....	15
EFECTO DE LOS IONES EN LA ACTIVIDAD DE LA BADH.....	15
EFECTO DE LOS IONES EN LA ESTABILIDAD DE LA BADH.....	15
ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LA BADH.....	16
EXPERIMENTOS DE ENTRECruzAMIENTO.....	17
ANÁLISIS DE DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ.....	17
RESULTADOS Y DISCUSION.....	19
CONCLUSIONES.....	45
BIBLIOGRAFÍA.....	46

EFEECTO DE CATIONES MONOVALENTES SOBRE LA ACTIVIDAD Y ESTABILIDAD DE LA BETAINA ALDEHIDO DESHIDROGENASA DE *Pseudomonas aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

LAS ENZIMAS

Una enzima es una proteína que cataliza una reacción termodinámicamente posible. Las enzimas cuentan con tres características distintivas: (1) Gran poder catalítico. Pueden acelerar la velocidad de una reacción hacia el equilibrio, sin cambiar la constante de ese equilibrio, acelerando la reacción entre 10^3 y 10^{17} veces, (2) Alta especificidad. Las enzimas son muy selectivas, tanto en las sustancias con las que interactúan como en las reacciones que catalizan, y (3) Se pueden regular. La actividad de las enzimas puede ser regulada variando la cantidad de enzima, por interacción con activadores e inhibidores y/o por modificaciones covalentes (Horton *et al.*, 1996). La elevada especificidad de la función catalítica de las enzimas se debe a su naturaleza proteica, pues es su estructura primaria la que le permite formar estructuras sumamente complejas e intervenir en un mecanismo de reacción particular, así como la capacidad para identificar sólo a un determinado grupo de sustratos (Conn y Stumpf, 1991, Horton *et al.*, 1996)

La estructura primaria de una proteína es también quien dicta su estructura tridimensional, llevando de manera espontánea a un plegamiento que termina en la conformación nativa de la proteína. El plegamiento de un polipéptido inicia con la formación de pequeños alargamientos de la estructura secundaria, como son α -hélices y hojas β -plegadas, que pueden actuar como un núcleo para la estabilización de otras regiones de la proteína. Esos núcleos son muy pequeños (de 8 a 15 residuos), y aparecen o desaparecen en cuestión de milisegundos. El núcleo con la adecuada estructura nativa crece por difusión y adhesión de dos o más núcleos similares; la estabilidad de esas nuevas regiones aumenta con el tamaño, funcionando como un proceso de plegamiento jerárquico, en donde las unidades plegadas se condensan para formar grandes unidades plegadas, lo que se confirma con la observación de que los dominios están formados por

subdominios. El multidominio formado es llamado glóbulo fundido, una entidad que tiene una extensa estructura secundaria pero una estructura terciaria desordenada, con su parte hidrofóbica parcialmente expuesta al solvente. A continuación, series de conformaciones relativamente pequeñas se rearreglan de manera globular para formar la estructura terciaria más compacta. La proteína requiere de cierto número de subunidades ensambladas para formar su estructura cuaternaria, y finalmente ocurren una serie de ligeros ajustes en la estructura de la proteína (Voet y Voet, 1995).

El plegamiento *in vivo* de los polipéptidos, hasta su conformación nativa, se realiza en forma altamente eficiente en pocos minutos. En este proceso participan tres tipos de proteínas accesorias: Las protein disulfuro (PDI), unas enzimas homodiméricas eucarióticas de 486 residuos por unidad que catalizan reacciones de intercambio de disulfuros; las *cis-trans*-prolil isomerasas (PPIs), debido a que la mayoría de los polipéptidos son biosintetizados con un alto porcentaje de sus aminoácidos en la conformación *trans*, y únicamente alrededor del 10% asumen la conformación *cis*, las PPIs catalizan la conversión de los aminoácidos desde su conformación *trans* a *cis*, acelerando el plegamiento de la proteína; las chaperonas son la tercer clase de proteínas que facilitan y aceleran la velocidad del plegamiento. Estas últimas proteínas no cambian el resultado final del plegamiento, pero actúan para prevenir la formación de intermediarios inactivos y agregados que tienden a formarse por complementariedad de superficies durante el proceso. La mayoría de las proteínas desplegadas que se renaturalizan *in vitro* forman estructuras inestables, inactivas y agregados inespecíficos (Devlin, 1997).

Como ya se mencionó, la secuencia de aminoácidos determina las características de cada proteína, desde su estructura tridimensional hasta su función biológica. Cada aminoácido le concede a la proteína diversas facultades: la asparagina y la glutamina tienen la propiedad de formar puentes de hidrógeno, que junto con los residuos hidrofóbicos proveen a la proteína de una importante fuerza para el plegamiento; la prolina interviene en la estructura secundaria para formar giros o cambios de dirección en el polipéptido; la glicina, por ser muy pequeña, puede asumir conformaciones generalmente restringidas para cerrar

contactos del carbono β , y por ser más flexible que otros residuos contribuye a las necesidades de movimiento en la proteína; la serina y la treonina cuentan con grupos hidroxilos alifáticos capaces de formar puentes de hidrogeno con grupos donadores o aceptores, como son el nitrógeno del imino o el oxígeno del carbonilo de la cadena; la cisteína puede formar puentes disulfuro, que juegan un papel importante en la estabilización de la estructura de las proteínas. Los puentes disulfuro incrementan la estabilidad conformacional, impidiendo el desplegamiento de las proteínas y disminuyendo su entropía conformacional (<http://www.friedli.com/herbs/phytochem/proteins.html>).

DESNATURALIZACION DE PROTEINAS

La desnaturalización de las proteínas se expresa como cambios en las propiedades físicas y químicas de la molécula. Este proceso implica un desplegamiento y/o una alteración total de la estructura y es la respuesta de la proteína al calor, los ácidos, las bases, los iones, o cualquier agente que provoque un cambio importante en su estructura, el cual puede ser de dos tipos: molecular, cuando hablamos de los cambios en la estructura de la molécula, y operacional, en términos de cambios en sus propiedades medibles (Jaenicke, 1991). La desnaturalización ocurre cuando la proteína pierde su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, aunque no necesariamente la primaria. El estado de desnaturalización siempre es correlacionado con la pérdida de la función de la proteína, aunque esta pérdida no necesariamente está relacionada a la desnaturalización; sin embargo, pequeños cambios en la conformación pueden ser suficientes para inactivar una proteína. La diferencia de energía libre entre ambas estructuras puede ser baja en algunos casos, como la de tres o cuatro uniones no covalentes; así, la pérdida de solo un puente de hidrógeno o de alguna interacción electrostática o hidrofóbica puede desestabilizar la estructura plegada (Devlin, 1997). En ocasiones, cuando el grado de desnaturalización no es severo, es posible que la proteína pueda renaturalizarse, basándose para esto en su estructura interna; por ejemplo, algunos detergentes que solo interrumpen la

estructura secundaria, terciaria y cuaternaria permiten a la proteína que se renaturalice cuando son removidos (Horton *et al.*, 1996).

ESTABILIDAD

La gran estabilidad de algunas proteínas ha sido atribuida a muchas características, una de las más importantes es la hidrofobicidad (Haney *et al.*, 1997), aunque también se habla de un significativo empacamiento y una disminución en el tamaño de las asas (Russell *et al.*, 1998), de la disminución en número y tamaño de las cavidades (Kumar *et al.*, 2000), de la sustitución de aminoácidos (Haney *et al.*, 1997, Russell *et al.*, 1998) y de un incremento en la presencia de puentes de hidrógeno (Vogt y Argos 1997) y puentes salinos (Kumar *et al.*, 2000b, Haney *et al.*, 1997, Russell *et al.*, 1998).

En general, los estudios sobre acoplamiento y estabilidad proteica se han hecho con moléculas aisladas de organismos extremófilos. Se piensa que la comparación de las secuencias y las estructuras de las proteínas de los microorganismos extremófilos, con su contraparte de organismos mesofílicos, puede explicar los mecanismos que la naturaleza ha empleado para incrementar la estabilidad de las proteínas (Yip *et al.*, 1998, Jaenicke y Bohm, 1998). Como su nombre lo dice, los organismos extremófilos viven en ambientes extremos, como son: la alta presión (>400 atmósferas), la alta temperatura y el pH no fisiológico; como en las áreas submarinas hidrotermales, las bajas temperaturas, como en la Antártica y las altas concentraciones de sal (hasta 5M) (Danson *et al.*, 2000); este grupo incluye a los termófilos, a los halófilos, a los acidófilos, a los alcalófilos, a los psicrófilos, a los osmófilos, y a los barófilos, así como a los organismos resistentes a la radiación y a los metales pesados (Gazerro, 1997).

Las características de estabilidad que tiene una proteína parecen ser dependientes del tipo de organismo a la que pertenece y del ambiente al que está expuesto (Cuadro 1).

Proteína	Causa de Estabilidad
Citrato Sintetasa <i>Pyrococcus Furiosus</i>	Incremento en la compactación, aumento en la interacción de las subunidades, incremento en los puentes iónicos y acortamiento de los loops
Ferredoxina <i>Thermotoga maritima</i>	Estabilización por α hélices, reemplazo de residuos por glicinas, e incremento en puentes de hidrógeno
Ferredoxina <i>Synechococcus elongatus</i>	Extensión del centro hidrofóbico
Glutamato deshidrogenasa <i>P. furiosus</i>	Serie de pares iónicos, aumento en el empaquetamiento, incremento en la hidrofobicidad y remplazo de aminoácidos.
Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa <i>T. maritima</i>	Notable incremento en los puentes salinos
Ind: 3-gliceraldehido fosfato sintetasa <i>Sulfolobus solfataricus</i>	Incremento en puentes salinos, y en interacciones hidrofóbicas
3-sopropilmalato deshidrogenasa <i>Thermus thermophilus</i>	Incremento en pares iónicos, en puentes de hidrógeno, en interacciones de subunidades que provocan hidrofobicidad y empaquetamiento
Lactato deshidrogenasa <i>T. maritima</i>	Incremento en el número de pares iónicos, presencia de α hélices, y menos volumen de cavidades
Fosfoglicerato cinasa <i>T. maritima</i>	Incremento en pares iónicos, y estabilización por α hélices

CUADRO 1. Causas de estabilidad de algunas enzimas que pertenecen a diversos organismos. Lista tomada de Jaenicke y Bohm, 1998.

Hidrofobicidad

Se ha dicho que la principal fuerza para el plegamiento de las proteínas es la hidrofobicidad y se ha sugerido que las proteínas termotolerantes son parcialmente más hidrofóbicas que sus contrapartes en organismos mesofílicos (Haney *et al.*, 1997). La hidrofobicidad crea una fuerza de acoplamiento en la proteína, jugando un importante papel biológico al participar en la estructura, la función y la estabilidad de éstas (Day *et al.*, 1996). En general, la mayoría de los residuos hidrofóbicos quedan en el centro de la proteína, mientras que los residuos hidrofílicos se presentan en la superficie; consecuentemente, al irse formando la estructura terciaria de la proteína se va generando una forma globular y compacta (Tsai y Nussinov, 1997).

Empaquetamiento

Se ha visto que entre mayor empaquetamiento haya, mayor será la estabilidad de las proteínas termotolerantes (Russell *et al.*, 1998). El empaquetamiento ha sido definido como el radio del área de la superficie accesible (ASA) de una proteína, considerando que ésta es más o menos esférica: entre mayor sea el empaquetamiento menor será el valor de su radio (Kumar *et al.*, 2000).

Puentes de sal y puentes de hidrógeno

Los puentes salinos y los de hidrógeno juegan un papel central en la estabilidad y el plegamiento de las proteínas, formando interacciones electrostáticas dentro de ellas (Xu *et al.*, 1997). Las proteínas termófilas requieren de un control conformacional que evite el desorden de sus constituyentes. La plasticidad estructural de una proteína puede ser reducida por las interacciones electrostáticas, las que forman barreras de energía que resisten al desplegamiento, sobre todo el que es causado por altas temperaturas (Kumar *et al.*, 2000b). Esto concuerda con lo reportado por Vogt *et al.*, en 1997, quienes al comparar las proteínas de 16 familias con diferente estabilidad térmica encontró que la termoestabilidad y el número de puentes de hidrógeno están correlacionadas en un 80%.

Flexibilidad

En general las proteínas son moléculas altamente flexibles; sin embargo, se sabe que algunas de sus partes son más rígidas y compactas que otras. Estas regiones se caracterizan por su hidrofobicidad y contribuyen de manera importante a la estabilización electrostática de la proteína. No obstante, debemos considerar que si las proteínas fueran demasiado rígidas no podrían cumplir con su función biológica (Ma *et al.*, 1999), sobre todo si hablamos de proteínas con función enzimática. Algunos estudios han demostrado que muchas de las asas de las proteínas más estables son más flexibles y pequeñas que los de las menos estables (Muir *et al.*, 1995); además, se ha visto que los dominios flexibles facilitan la actividad catalítica de algunas enzimas a bajas temperaturas, como la de la citrato sintetasa de una bacteria de la Antártica (Russell *et al.*, 1998).

Substitución de aminoácidos.

En 1996 Querol *et al.*, sugirieron que en proteínas termotolerantes la substitución de algunos aminoácidos aumenta su estabilidad, al incrementar el número de puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, la hidrofobicidad y el empaquetamiento. Por otra parte, Haney *et al.*, 1999, mencionan que el

aumento en la estabilidad es debido a la presencia de algunos residuos, los que provocan cambios en la flexibilidad y en la conformación de las α hélices.

Gazerro, en 1997, señala que el cambio de varios aminoácidos produce características que incrementan la estabilidad; por ejemplo: Ser por Ala o Val por Ala producen un aumento en la conformación de α hélices y un aumento en la hidrofobicidad; Gly por Ala, Ser por Thr/Gly/Ala y Asp por Asn o Glu provocan una disminución en la flexibilidad y un incremento en la hidrofobicidad. Este autor menciona que los cinco aminoácidos que cambian más entre enzimas termofilicas y mesofilicas son: Lys, Ser, Gly, Ser e Ile por Arg, Ala, Ala, Thr y Val, respectivamente.

Los estudios acerca de los aminoácidos que son necesarios para producir una proteína más estable en *Pyrococcus furiosus* revelan que se requiere de una combinación de fuerzas, incluyendo los efectos electrostáticos, las interacciones hidrofóbicas, los puentes de hidrógeno y los cambios en la densidad de empaquetamiento (Yip *et al.*, 1998).

FACTORES EXTRÍNSECOS Y ESTABILIDAD PROTEÍCA.

Muchas enzimas requieren componentes no proteicos llamados cofactores para realizar sus funciones catalíticas. Dichos cofactores pueden ser iones metálicos o moléculas orgánicas (coenzimas), que por ser menos complejos que las enzimas suelen ser más estables al calor; estas moléculas usualmente son parte activa de la reacción que cataliza la enzima, sirviendo como acarreadores intermediarios de grupos funcionales en la conversión del sustrato al producto. Algunos de estos cofactores están estrechamente relacionados a su enzima, en ocasiones incluso por uniones covalentes (Garrett y Grishman, 1999).

En algunas enzimas los iones juegan un papel central en el mantenimiento de su actividad (Ioannou y Coutsogeorgopoulos, 1997). Son frecuentemente requeridos para estabilizarlas, son responsables de una particular conformación proteica, e importantes para su máxima actividad y en ocasiones llegan a formar parte del sitio activo de la enzima (Flores *et al.*, 1996).

Aproximadamente una tercera parte del total de las enzimas conocidas requiere de iones metálicos para su actividad catalítica. Con base en estas interacciones proteína-ion se han clasificado en: metaloenzimas, que contienen un ion metálico estrechamente unido (generalmente metales de transición como Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , o Mn^{2+}) y las enzimas activadas por iones presentes en el medio, los que se unen débilmente a las proteínas. Estos últimos comúnmente son metales alcalinos y alcalinoterreos, como Na^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+ (Voet y Voet, 1995). El potasio es requerido universalmente y una gran variedad de enzimas son específicamente activadas por él (Brock, 1978). Se ha encontrado que varios organismos requieren de este ion para tener una actividad optima, alcanzando una activación superior a 10 veces; por ejemplo, la piruvato cinasa de músculo de conejo aumenta 12 veces su actividad en presencia de K^+ (Laughlin y Reed, 1997), mientras que la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) tipo II de humano, sobreexpresada en *Escherichia coli* y que es activada por varios cationes monovalentes, presenta poca actividad en ausencia de K^+ . En la condición contraria la actividad de la IMPDH aumenta 100 veces, demostrando que el K^+ es un activador esencial para esta enzima (Xiang *et al.*, 1996). También se ha visto para algunas enzimas, como una peptidiltransferasa eucariótica, que la velocidad de reacción depende directamente de la concentración de K^+ , pues aquella incrementa en forma directa al aumento en la concentración del ion (Ioannou y Coutsogeorgopoulos, 1997). La actividad de la ATPasa de la chaperona Hsc70 de bovino, también es dependiente de cationes monovalentes, y se ha encontrado que tanto la hidrólisis del ATP, así como la unión y separación del nucleótido, son afectados por el tipo y la concentración del ion (O'Brien y McKay, 1995); el K^+ facilita la hidrólisis del ATP estabilizando las cargas parcialmente negativas de los oxígenos del fosfato γ (Wilbanks y McKay, 1995).

La enzima diacilglicina descarboxilasa (DGD) de *Pseudomonas cepacia*, que también es activada por K^+ y Rb^+ , tiene un sitio de unión para estos iones muy cerca del sitio activo. En el cristal de dicha proteína se encontró que al cambiar Na^+ por K^+ se afecta la conformación de dos residuos del sitio activo (Toney *et al.*, 1993). En una comparación de la estructura de DGD unida a Li^+ ,

Na⁺, K⁺, o Rb⁺, se encontró una fuerte correlación entre la estructura del sitio activo y actividad de la enzima (Hohenester *et al.*, 1994).

La glutamina sintetasa bacteriana tiene un sitio para cationes monovalentes; se ha propuesto que tal sitio tiene dos funciones: (1) contribuir con su carga positiva a la estabilidad estructural, causando efectos electrostáticos, y (2) aumentar la unión del sustrato a la enzima (Liaw *et al.*, 1995).

ENZIMAS ALDEHIDO DESHIDROGENASAS

Las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs) se encuentran en casi todos los organismos, localizándoseles en la mayoría de los compartimentos de las células de mamíferos (Hurley, 1992). Las aldehído deshidrogenasas son capaces de oxidar tanto aldehídos alifáticos como aromáticos, que se involucran en diversos procesos fisiológicos, como son: el metabolismo del carbono, la tolerancia al etanol, la neurotransmisión, la carcinogénesis y la inmunosupresión (Pietruszko, 1989, citado en Boyd *et al.*, 1992). La reacción general que catalizan estas enzimas es representada en la siguiente ecuación:



Cuando el agua funciona como un reactante (A = OH en la reacción, y HA = H₂O), se denominan de la clase I; cuando A representa a un fosfato, un arsenato o un mercaptano se denominan de la clase II, y la clase III ha sido reservada para las enzimas que combinan las funciones ya mencionadas (Jakoby, 1963).

Se ha hecho otra clasificación de las aldehído deshidrogenasas, basándose en sus secuencias de aminoácidos, en donde se habla de enzimas de clase I: que incluye a la mayoría de las formas citosólicas; clase II: que incluye a la mayoría de las formas mitocondriales y la clase III: que incluye diversas enzimas, como algunas específicas para tumores inducibles y las del retículo endoplásmico (Lindahl y Hempel, 1991, tomado de Hurley, 1992). Las de clase I son homotetrámeros compuestos de 500 residuos de aminoácidos, y las de clase III tienden a ser diméricas y más pequeñas que las de clase I y II (Hempel y Lindahl,

1989 tomado de Hurley, 1992). Se ha encontrado, al comparar las aldehído deshidrogenasas provenientes de diferentes organismos, que a pesar de que difieren en su estructura cuaternaria y en el tamaño de su subunidad, todas ellas tienen una estructura tridimensional similar: poseen tres dominios, uno de enlace a la coenzima, un dominio catalítico y otro de oligomerización (Johansson *et al.*, 1998).

La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) (Ec, 1.2.1.8) es una enzima que pertenece al grupo de las ALDHs; en algunos organismos es específica para betaína aldehído, lo que puede reflejar la divergencia de especificidad de dicho grupo o una selección para especificidad en BADH (Boyd *et al.*, 1992). El papel de esta enzima resulta trascendental para la adaptación de los organismos al estrés osmótico, ya que se involucra en la síntesis del osmoprotector glicina betaína (GB) (Velasco-García *et al.*, 1999) a través de la siguiente reacción:

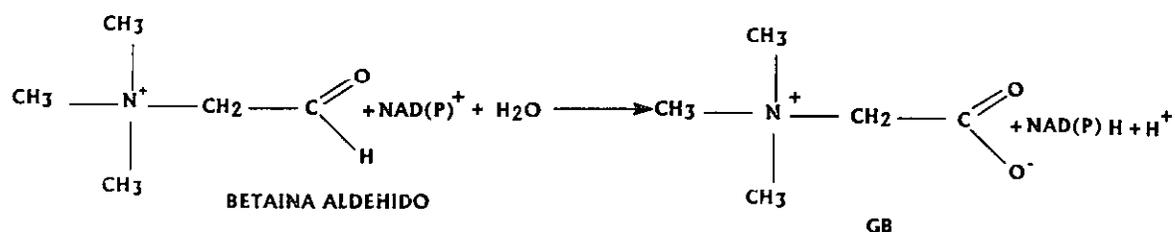


Figura 1. Reacción catalizada por la BADH

La glicina betaína puede evitar la inhibición de la respiración causada por una alta concentración de NaCl en bacterias Ba1, que son mesuradamente halofílicas (Rafaeli-Eshkol y Avi-Dor, 1968); revierte los efectos de una alta concentración de NaCl sobre el transporte activo de *Vibrio costicola* (Kushner *et al.*, 1983); disminuye los efectos negativos del estrés osmótico sobre la replicación de DNA y la división celular en *E. coli* (Meury, 1988, tomado de Choquet *et al.*, 1991); revierte parcialmente los efectos inhibitorios que el Cl⁻ tiene *in vitro* sobre la síntesis de proteínas de *Vibrio costicola* (Kamekura y Kushner, 1984) y protege a

las enzimas intracelulares de microorganismos y plantas contra la inactivación iónica (Pollard y Jones, 1979).

La BADH ha sido encontrada en muchos organismos (Mori *et al.*, 1992), entre los que se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* (Nawasawa *et al.*, 1976), una bacteria que provoca infecciones oportunistas en humanos, en particular cuando padecen de cáncer, lesiones por quemaduras o fibrosis quística (FQ) (Kilbourn, 1978). Se ha demostrado que el incremento de electrolitos en los fluidos, una característica de la FQ (Smith *et al.*, 1996), inhibe la actividad bactericida normal del pulmón; debido a esto, en los pacientes con FQ se ve disminuida la capacidad para defenderse de *P. aeruginosa*.

La BADH parece tener un papel clave en el metabolismo de la colina (ver figura 2), no sólo al participar en la adaptación de la bacteria a un estrés osmótico, si no también al actuar sobre su sustrato, la betaína aldehído, un compuesto tóxico. Con relación a esto, recientemente se demostró que una mutante de *P. aeruginosa* sin BADH no crece en un medio con colina o con colina y GB (Sage *et al.*, 1997). Este resultado parece estar dado por el efecto tóxico de la betaína aldehído que se acumula en la mutante. Lo anterior sugiere que la BADH puede ser un blanco adecuado para la acción de algunos inhibidores de esta enzima como agentes antimicrobianos.

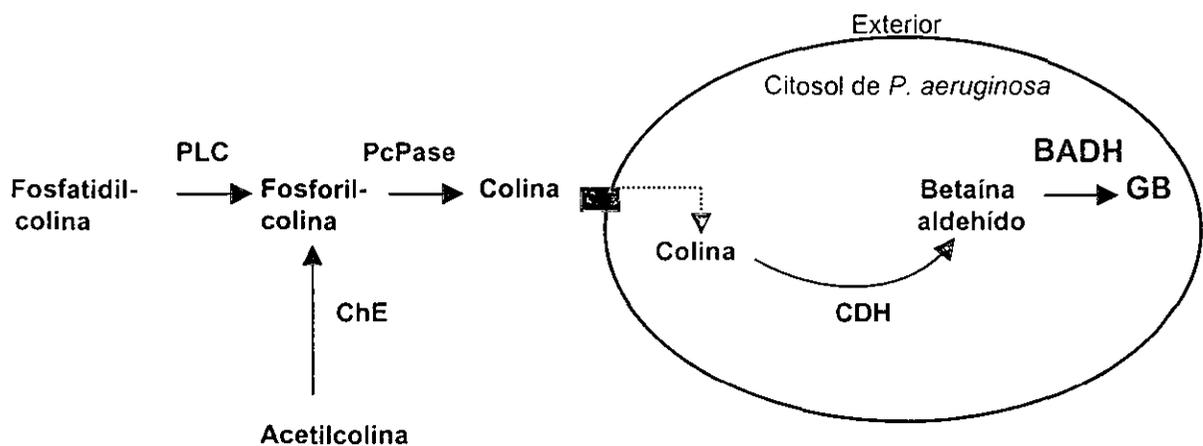


Figura 2. Síntesis de la GB en *P. aeruginosa*. PLC, fosfolipasa C; PcPase, fosfatasa de fosforilcolina; ChE, acetil colinesterasa; CDH, colina deshidrogenasa; BADH, betaína aldehído deshidrogenasa.

ANTECEDENTES

REQUERIMIENTO DE IONES INORGÁNICOS PARA LA ACTIVACIÓN DE ALDHs.

Algunas ALDHs pueden ser activadas por iones, tal es el caso de las dos isoenzimas descritas para *Saccharomyces cerevisiae*; la primera está localizada en la mitocondria y requiere K^+ para alcanzar su máxima actividad, formando un complejo entre la enzima, el ión y el NADH; la segunda es citosólica y es activada por Mg^{2+} (Dickinson y Haywood, 1987). Se ha visto que en ausencia del K^+ la enzima mitocondrial es inestable y resulta difícil de purificar (Bostian y Betts, 1978). La acetaldehído deshidrogenasa, también de *S. cerevisiae*, es activada por K^+ , influenciando la viabilidad del sitio activo de la enzima y resultando ser, además de un activador, un protector contra la inactivación por calor y un reactivador para esta enzima (Sorger y Evans, 1965). La betaína aldehído deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* también es activada por potasio, siendo estimulada aproximadamente 150% cuando se adiciona KCl 0.2 M (Boch *et al.*, 1997).

En un estudio realizado recientemente con la BADH de *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 1999) se determinó que la enzima es inestable al exponerla a 40°C o al amortiguador Tris-HCl. En el primero de los casos su coenzima (el NADP⁺), fue suficiente para protegerla de la inactivación, mientras que en la presencia del Tris-HCl este nucleótido y el potasio la protegieron parcialmente y actuaron de forma sinérgica para mantenerla totalmente activa. En este mismo trabajo el Na⁺, utilizado a una concentración equimolar a la del K⁺, no protegió a la enzima ante ambos factores inactivantes, lo que indica que es este último ión y no el Cl⁻ o la fuerza iónica el que estabiliza a la enzima.

Experimentos preliminares más recientes (Velasco-García, 2000), demuestran que la enzima BADH inactivada en el buffer Tris-HCl, en ausencia de K⁺, presenta cambios en su espectro de emisión de fluorescencia del triptofano, sugiriendo que estos pueden ser resultado de cambios en la estructura de la proteína que lleva a un desplegamiento y a la inactivación de la enzima.

OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo consistió en investigar el efecto de algunos cationes monovalentes sobre la actividad y la estabilidad de la betaina aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello se cumplieron los siguientes objetivos particulares:

Se determinó el efecto que tienen los iones K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ y Li^+ , en la actividad *in vitro* de dicha enzima.

Se estableció la concentración óptima de estos iones, como activadores de la enzima.

Se Investigó el efecto que tienen los iones ya mencionados, en ausencia y presencia de $NADP^+$, sobre la estabilidad de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa*.

Se investigó si los cambios en la estabilidad de la BADH tienen relación con cambios en su estructura.

METODOLOGÍA

CEPA BACTERIANA Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se trabajó con la cepa de *Escherichia coli* BL21(DE3)pLyS de Stratagene, que ha sido transformada (datos no publicados) con el gen de la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* inserto en el vector pCALn, también de Stratagene. Las bacterias fueron crecidas aeróbicamente a 37°C, en medio líquido LB (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando un baño con agitación orbital (250 rpm). Cuando los cultivos alcanzaron un crecimiento correspondiente a una turbidez de 0.6 unidades de absorbancia ($\lambda=540$ nm), se les agregó IPTG (Isopropil β -D-Tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM, para inducir y sobreexpresar la BADH de *P. aeruginosa*.

PURIFICACIÓN DE LA BADH

Se centrifugó el cultivo a 10,000 rpm durante 10 min y la pastilla se resuspendió en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6.5, conteniendo β -mercaptoetanol 5 mM; las células se sonicaron durante 1.5 min utilizando 40 Watts de salida en el sonicador y manteniendo una baja temperatura con baño de hielo. Se volvió a centrifugar a 10,000 rpm durante 20 min a 4°C, para después aplicar el sobrenadante en una columna de sefarosa Q de flujo rápido (marca Sigma) previamente equilibrada con 150 mL de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 6.5, β -mercaptoetanol 20 mM y sacarosa al 20%. Después se lavó la columna con este mismo buffer y se eluyó con un gradiente de cloruro de potasio de 0 a 250 mM (110 mL en total, con un flujo de 1 mL/min). A las fracciones obtenidas se les midió la actividad por espectrofotometría, siguiendo la aparición de NADPH a 340 nm, a una temperatura de 30°C. El medio de reacción (0.5 mL) contenía 5 μ L de la fracción y una concentración final de betaína aldehído 1.0 mM y NADP⁺ 0.3 mM, en amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 8.0. Las fracciones que presentaron actividad fueron aplicadas en una columna de 2'5' ADP sefarosa 4B (marca Amersham Pharmacia Biotech AB), equilibrada previamente con amortiguador de fosfato de potasio 50mM pH 6.0; después se

lavó con 100 mL de amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 5.8, conteniendo, β -mercaptoetanol 10 mM, sacarosa 20%, EDTA 0.1 mM y cloruro de potasio 25 mM. La proteína BADH se eluyó de la columna con un gradiente lineal de pH (de 5.8 a 8.5), utilizando 35 mL de un amortiguador que contenía los mismos ingredientes que el utilizado para lavar la columna. Las fracciones que tenían actividad de BADH se juntaron y posteriormente se almacenaron en alícuotas a -20°C . La proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976). Una unidad de la enzima es definida como la cantidad de proteína que cataliza la formación de 1 μmol de NADPH por minuto, en las condiciones de medición de actividad antes descritas.

GELES

La enzima (2 μg en el gel de la Figura 3 y 5.26 μg en el de la Figura 19), se sembró en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 8% con gel concentrador al 4%, según el sistema de Laemmli, 1970, utilizando una cámara Miniprotean II (Bio-Rad). Finalmente el gel fue teñido mediante la tinción con plata de Sasse y Callagher, 1996.

EFFECTO DE LOS IONES EN LA ACTIVIDAD DE LA BADH

Se midió el efecto que tienen los iones K^+ , Na^+ , NH_4^+ , Rb^+ , Cs^+ y Li^+ , (sales de cloro), sobre la actividad *in vitro* de la BADH de *P. aeruginosa*. El medio de reacción contenía en un volumen final de 0.5 mL, amortiguador Tris-HCl (Tris [hydroxymethyl] amino-metano) 200 mM, pH 8.0, betaina aldehído 1.0 mM, NADP^+ 300 μM y las sales antes mencionadas en un intervalo de concentración de 0 a 200 mM. La reacción se inició agregando al medio 360 ng de la enzima. La aparición de NADPH se midió a 340 nm, con una temperatura de 30°C .

EFFECTO DE LOS IONES EN LA ESTABILIDAD DE LA BADH

Habiéndose determinado la concentración de los cationes en la que la BADH presenta la máxima actividad, se procedió a conocer si éstos o el NADP^+ , eran capaces de estabilizar a la enzima, así como si esta función la llevan a cabo

en forma independiente o sinérgica. Para ello se utilizaron dos medios: uno de incubación y otro de reacción. El medio de incubación se utilizó en tres diferentes combinaciones, que consistieron de Tris/HCl 32 mM y los siguientes componentes, en un volumen final de 150 μ L:

I: NADP⁺ en un intervalo de 25 a 500 μ M.

II: KCl, NH₄Cl y RbCl en un intervalo de 0 a 200 mM.

III: NADP⁺ 50 μ M junto con 25 μ M de cada una de las sales antes mencionadas.

Se adicionó la enzima (5.4 μ g) a cada uno de estos medios para después tomar una alícuota de 10 μ L (con 360 ng de proteína) a los 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos de incubación. Se midió la actividad de la enzima que iba en estos 10 μ L utilizando las condiciones y el medio de reacción que se describen en la sección anterior, con la salvedad de que en esta ocasión se utilizó en dicho medio la concentración del ión respectivo que se determinó como óptima previamente. La temperatura en los medios de reacción y de incubación fue de 30°C.

ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DE LA BADH.

Con la finalidad de conocer si el proceso de inactivación de la enzima BADH resultaba de cambios en la estructura proteica, se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia del triptofano. Para ello se incubó a la enzima en los medios y condiciones descritos en la sección anterior, obteniendo los espectros a 0 y 10 minutos de incubación, en un espectrofotómetro de luminiscencia marca Perkin-Elmer, modelo LS50B. La longitud de onda de excitación fue de 296 nm (con un ancho de banda de 5nm), y el registro de la emisión se hizo de 200 a 400 nm (con un ancho de banda de 10 nm).

Cuando la enzima estuvo en presencia de NADP⁺ fue necesario hacer una corrección para descontar los efectos de filtro interno que produce esta molécula:

$$F_c = F_{obs} \text{antilog}[(A_{ex} + A_{em})/2]$$

en donde F_c es la intensidad correcta, F_{obs} la intensidad medida, A_{ex} y A_{em} son las lecturas de absorbancia a la longitud de onda de excitación y de emisión respectivamente.

EXPERIMENTOS DE ENTRECruzAMIENTO

Como una forma más de conocer si el proceso de inactivación se relaciona con cambios en la estructura de la enzima, se llevaron a cabo experimentos de entrecruzamiento con glutaraldehído. Para ello únicamente se incubó a la enzima (78.96 μg) en los medios en donde se inactivó más rápidamente y en donde fue más estable. Pasados 60 minutos de incubación se agregaron a ambos medios glutaraldehído a una concentración final de 68 mM y se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente. El glutaraldehído que no reaccionó durante este tiempo se inactivó agregando glicina, pH 9.3, a una concentración final de 160 mM. Después de 10 minutos de haber agregado la glicina se mezcló con un volumen igual de la siguiente solución desnaturizante:

Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, Glicerol 22.5 %, SDS 3.5 mM, 2- β -mercaptoetanol 7.4 mM, y azul de bromofenol 0.05 %.

La mezcla se calentó durante 5 minutos a 100°C en baño maría, para después separar las proteínas en un gel.

ANÁLISIS DE DISPERSIÓN DINAMICA DE LUZ.

La agregación de la proteína se midió en un instrumento DynaPro-801 TC que utiliza un software Dynamics para analizar los datos (ambos de Protein Solutions Co.). La enzima (36 $\mu\text{g}/\text{mL}$), estaba contenida en 300 μL de los siguientes medios de incubación, en donde la coenzima tenía una concentración de 50 μM y las sales 25 mM

I: Amortiguador Tris-HCl

II: Amortiguador Tris-HCl + NADP^+ + NH_4Cl

III: Amortiguador Tris-HCl + NADP^+ + NaCl

Estos medios, junto con la enzima, fueron pasados por filtros Anotop 10 de 0.2 μm (Wathman). La dispersión del rayo de luz fue medida en un ángulo de 90° y las lecturas fueron tomadas cada 100 segundos aproximadamente, a una temperatura

de 30°C. El coeficiente de difusión translacional (D_T) de las partículas en solución fue evaluado midiendo las fluctuaciones en la intensidad de dispersión del rayo de luz, utilizando una función de autocorrelación. El radio hidrodinámico (R_H) de las partículas se deriva del D_T usando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_T = K_b T / 6\pi\eta R_H$$

en donde K_b es la constante de Boltzmann, T la temperatura absoluta en °Kelvin y η la viscosidad del solvente. La masa de las partículas es estimada a partir del R_H , asumiendo que éstas son más o menos esféricas.

RESULTADOS Y DISCUSION

El efecto de los cationes monovalentes sobre la actividad de las enzimas ha sido ampliamente documentado (Suelter, 1970; Hohenester *et al.*, 1994; Larsen *et al.*, 1994; Pace y Grimsley, 1987), sin embargo, poco se ha hablado sobre los efectos que éstos tienen en la estabilidad enzimática, y menos aún acerca de los cambios estructurales que presentan las enzimas durante el proceso de inactivación. El presente trabajo reporta los efectos de algunos cationes monovalentes en la actividad y estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*, así como los posibles cambios estructurales que presenta la enzima bajo condiciones inactivantes.

En primer lugar la enzima fue purificada hasta homogeneidad siguiendo una metodología previamente reportada (Velasco *et al.*, 1999) (Figura 3).

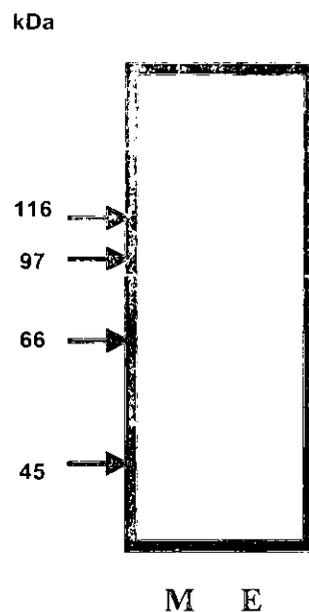


Figura 3. Gel de poliacrilamida mostrando la BADH de *P. aeruginosa* purificada. En el carril "E" se muestra la enzima BADH de *P. aeruginosa* (2 μ g) purificada desde la cepa de sobreexpresión *E. coli* BL21(DE3)PlysS. El carril "M" corresponde a los estándares de proteínas cuyos valores de masa molecular se indican a la izquierda del gel. El porcentaje de monómeros utilizados para hacer el gel fue de un 9%.

Después se procedió a conocer cual era el efecto de los cationes monovalentes sobre la actividad de la BADH *in vitro*, utilizando para ello diferentes concentraciones de los cloruros de potasio, de amonio, de sodio, de cesio, de litio y de rubidio en el medio de reacción (Figura 4); los resultados obtenidos muestran que la enzima expresa un óptimo de actividad a una concentración de 25 mM de cada una de estas sales, por lo que de aquí en adelante esta fue la concentración que se utilizó en los medios de reacción. Cabe mencionar que en todos los medios de reacción y de incubación se utilizó como amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0.

Los resultados mostrados en la Figura 4 concuerdan con las generalizaciones hechas por Evans y Sorger en 1966: a) un variado número de enzimas que catalizan reacciones diferentes son activadas por cationes monovalentes y b) las enzimas activadas por K^+ , también lo son por NH_4^+ y Rb^+ y en menor grado por Na^+ y Li^+ .

Varios autores han mencionado la importancia que tiene el radio iónico en la sustitución de un ion por otro como activador de algunas enzimas, coincidiendo todos ellos en que entre más distinto es el radio del ion sustituto, en relación al del original, menor efecto activador tendrá sobre la enzima (Laughlin y Reed, 1997; Wu y Scrimgeour, 1973; Hohenester *et al.*, 1994; Toney *et al.*, 1993; O'Brien y McKay, 1995; Wilbanks y McKay, 1995). Lo anterior es apoyado por la relación encontrada entre los valores del radio iónico mostrados en el siguiente cuadro y los resultados de la Figura 4.

CATION	^a RADIO IONICO (Å°)	^b DIAMETRO DEL ION HIDRATADO (Å°)
K^+	1.33	3.0
NH_4^+	1.43	2.5
Rb^+	1.47	2.5
Cs^+	1.67	2.5
Na^+	0.97	4.5
Li^+	0.68	6.0

Cuadro 2. Radio iónico y diámetro de los cationes monovalentes utilizados.

^aTomado de Laughlin y Reed, 1997. ^bTomado de Wu y Scrimgeour, 1973

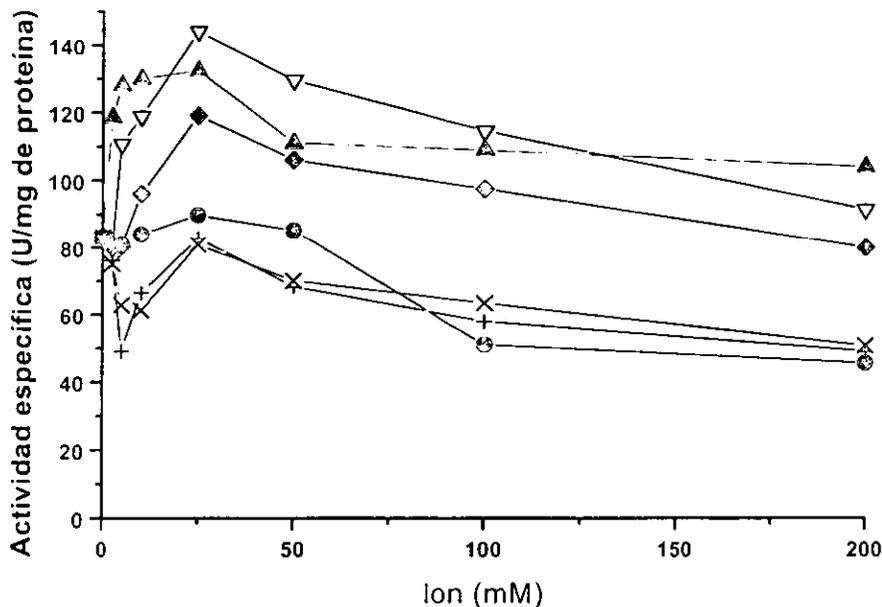


Figura 4. Efecto de los diferentes cationes sobre la actividad de la BADH de *P. aeruginosa*. El medio de reacción contenía la enzima (360 ng/0.5 mL), amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0, betaina aldehído 1 mM, NADP⁺ 0.3 mM y KCl (▲), NH₄Cl (●), NaCl (x), CsCl (◆), LiCl (+), o RbCl (▽) en un intervalo de concentración de 0 a 200 mM. La temperatura en el medio de reacción fue de 30°C.

Después se investigó el efecto del NADP⁺ sobre la estabilidad de la enzima. Para esto se incubó a la BADH en diferentes concentraciones de la coenzima (figura 5). Se puede observar que en ausencia de NADP⁺ la enzima prácticamente no muestra actividad después de los primeros 3 minutos de incubación. Se ha encontrado que las enzimas de *E. coli* y de *X. translucens* también son inestables en amortiguador tris HCl (Falkenberg y Stroem, 1990; Mori, *et al.*, 1992). A una concentración saturante de la coenzima (500 μM), que corresponde a 11 veces su K_d y 6 veces su K_m (Velasco *et al.*, 2000), la enzima de *P. aeruginosa* conserva aproximadamente un 65 % de su actividad luego de 60 minutos de incubación. En un trabajo previo (Velasco *et al.*, 1999) se utilizó hasta 1mM de NADP⁺, pero a esta concentración la enzima resultaba menos estable que en presencia de 500 μM de la coenzima.

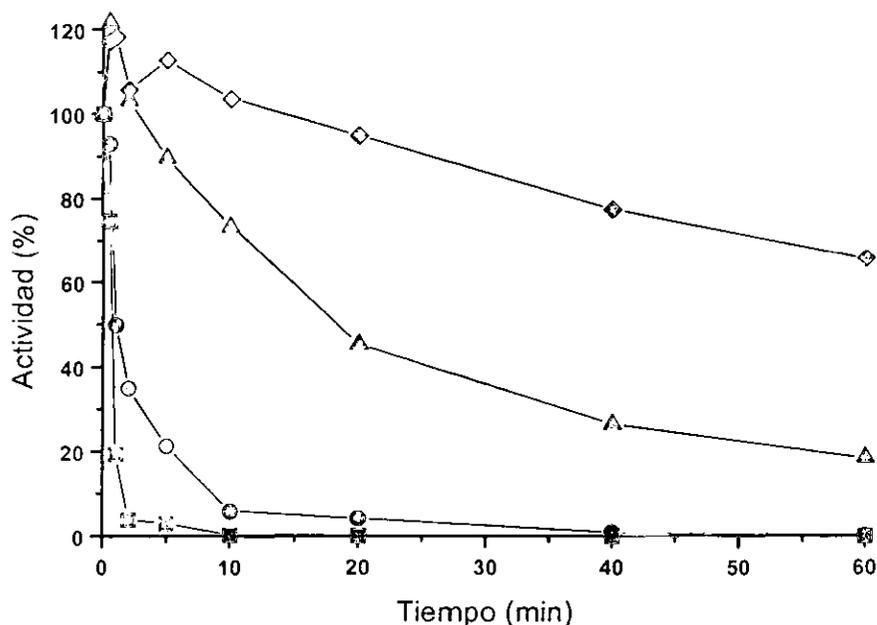


Figura 5. Efecto del NADP sobre la estabilidad de la BADH de *P aeruginosa*. La enzima (36 $\mu\text{g/mL}$) fue incubada en un medio que contenía amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0 y NADP 25 (■), 50 (●), 200 (▴) y 500 μM (◆). La actividad de la enzima fue medida a los tiempos que se muestran. El medio de reacción contenía la enzima (360 ng/0.5 mL) proveniente del medio de incubación, amortiguador Tris-HCl 32 mM, KCl 25 mM, betaina aldehído 1 mM y NADP⁺ 0.3 mM. La temperatura en los medios de incubación y de reacción fue de 30°C.

Existe evidencia de que el NADP⁺ puede proteger a otras enzimas de la inactivación. Park y Young, en 1998, demostraron que las enzimas 3-acetil piridina de hígado y músculo pectoral de humano son protegidas por NAD⁺ o NADP⁺ frente a la inactivación inducida por calor o tripsina.

Cuando se investigó la estabilidad de la enzima en presencia de los diferentes iones a una concentración de 25 mM pero sin NADP (Figura 6), se observó que a los 5 minutos de incubación los iones que más estabilizaron a la enzima (NH₄⁺ y K⁺) solo mantenían una actividad de entre el 10 y el 20 %, mientras que con el Rb⁺, el Cs⁺, el Li⁺ y el Na⁺ la enzima ya había sido completamente inactivada, al igual que cuando fue incubada solo con el amortiguador. La distinta estabilidad de la enzima a concentraciones equimolares de las diferentes sales indica que son los cationes, y no el cloro o la fuerza iónica, los que tienen el efecto sobre la estabilidad. Cuando se incrementó la

concentración de los iones a 200 mM (Figura 7), el efecto estabilizador de los iones NH_4^+ , K^+ y Rb^+ fue mayor, pero ninguno de ellos fue capaz de estabilizar totalmente a la enzima por si solo.

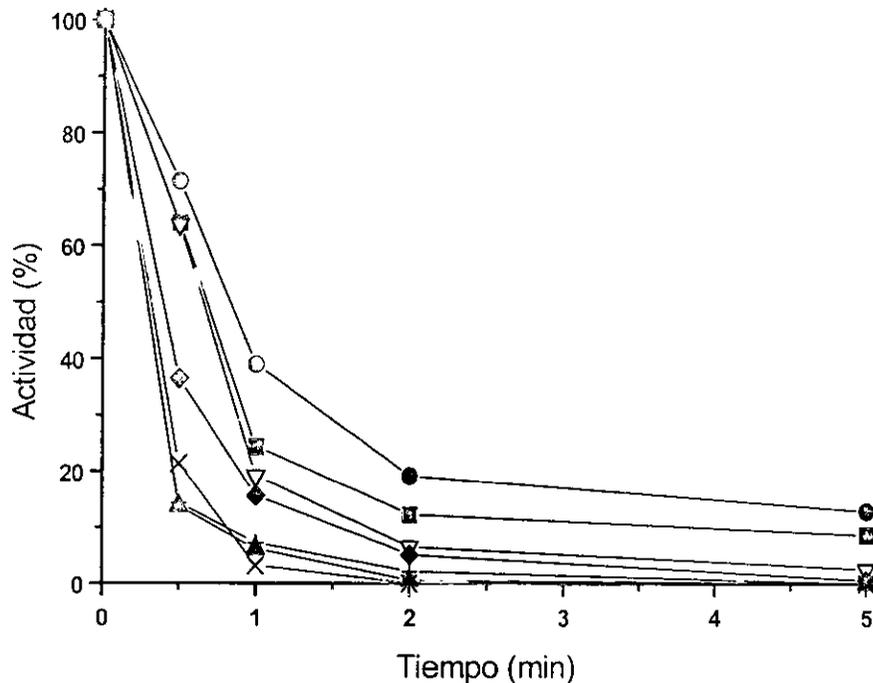


Figura 6. Efecto de los diferentes cationes sobre la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*. La enzima (36 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue incubada en un medio que contenía únicamente amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0 (■) ó este amortiguador junto con KCl (▲), NH_4^+ (●), NaCl (x), CsCl (◆), LiCl (+), y RbCl (▽) a una concentración de 25 mM. La actividad de la enzima fue medida a los tiempos que se muestran. El medio de reacción contenía la enzima (360 ng/0.5 mL) proveniente del medio de incubación, amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0, betaina aldehído 1 mM, NADP^+ 0.3 mM y la respectiva sal utilizada en el medio de incubación, a una concentración de 25 mM. La temperatura en el medio de incubación y de reacción fue de 30°C.

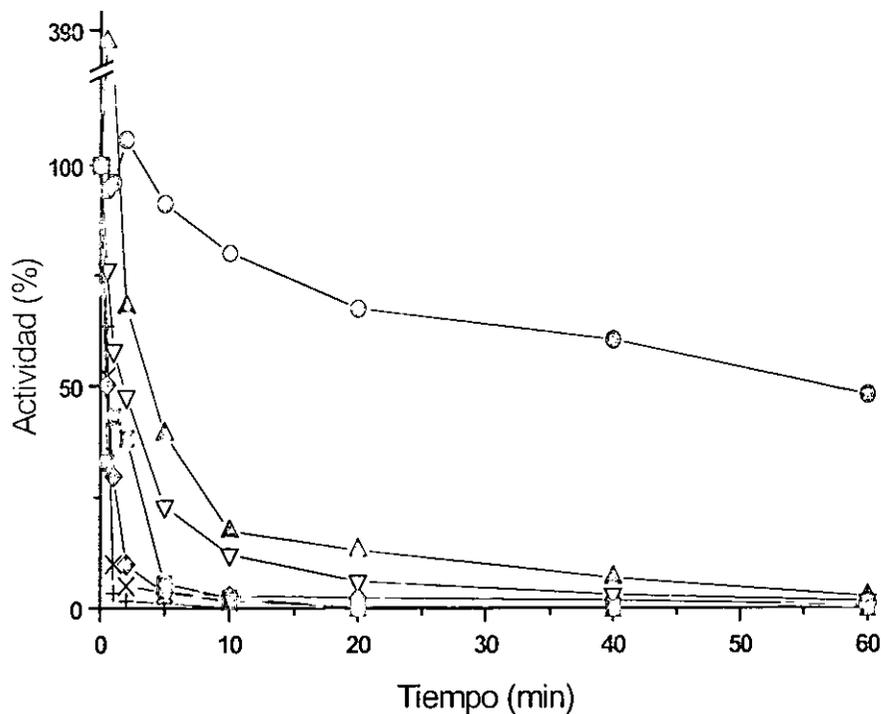


Figura 7. Efecto de los diferentes cationes sobre la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*. La enzima (36 $\mu\text{g/mL}$) fue incubada en un medio que contenía únicamente amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0 (■) ó este amortiguador junto con KCl (▲), NH_4^+ (●), NaCl (x), CsCl (◆), LiCl (+), y RbCl (▽) a una concentración de 200 mM. La actividad de la enzima fue determinada a los tiempos que se muestran. El medio de reacción contenía la enzima (360 ng/0.5 mL) proveniente del medio de incubación, amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0, betaina aldehído 1 mM, NADP^+ 0.3 mM y la respectiva sal utilizada en el medio de incubación, a una concentración de 25 mM. La temperatura en ambos medios fue de 30°C.

En un estudio previo (Velasco *et al.*, 1999), se encontró que la enzima era 100% estable en presencia de KCl 25 mM y NADP^+ 500 μM , concluyéndose que es necesaria la presencia de la coenzima y el catión para estabilizarla. Las Figuras 8 y 9 presentan la estabilidad de la BADH incubada con los diferentes cationes en presencia de 50 y 500 μM de NADP^+ , respectivamente. La Figura 8 muestra que los iones estabilizan a la enzima en el siguiente orden: $\text{NH}_4^+ > \text{ó} = \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Li}^+ > \text{Na}^+$.

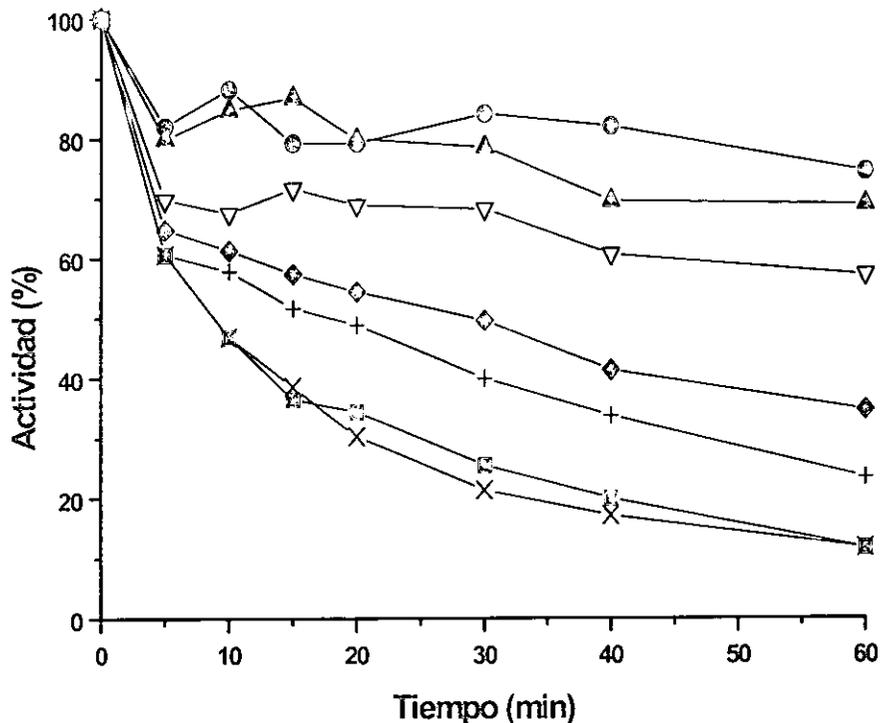


Figura 8. Efecto de los diferentes iones y el NADP⁺ sobre la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*. La enzima (36 μg/mL) fue incubada en un medio que contenía amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0 y NADP⁺ 50 μM (□), o a esta coenzima junto con NH₄Cl (●), KCl (▲), RbCl (▽), CsCl (◆), LiCl (+) ó NaCl (x) a una concentración de 25 mM. La actividad de la enzima fue medida a los tiempos mostrados. El medio de reacción contenía la enzima (360 ng/0.5 mL) proveniente del medio de incubación, amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0, betaina aldehído 1 mM, NADP⁺ 0.3 mM y la sal respectiva utilizada en el medio de incubación, a una concentración de 25 mM. La temperatura en el medio de incubación y de reacción fue de 30°C.

En la Figura 9 se observa que a una concentración de 500 μM de NADP⁺ y en presencia de cada uno de los cationes (25 mM), la enzima presenta una mayor estabilidad que con 50 μM de la coenzima (Figura 8). Lo que se relaciona con lo observado para la aldehído deshidrogenasa de *S. cerevisiae*, que es activada por potasio, y que requiere además del ión de NAD⁺ para una máxima actividad, quizás influenciando un cambio en la conformación de la enzima (Bostian y Betts, 1978).

En 1996 Dickinson confirma esta idea, explicando que el metal activador de esta enzima (el Mg^{2+}) incrementa en aproximadamente 100 veces la afinidad de la enzima por el $NADP^+$, y que la unión de esta coenzima produce un cambio conformacional en la enzima para que se desarrolle su máxima actividad. Por otro lado, la glutamina sintetasa (GS) bacteriana, que es activada por cationes monovalentes, une con más fuerza al catión en presencia de su cofactor ADP. Se ha demostrado que el ADP induce movimientos del Asp 50, que es el sitio de unión del catión, permitiendo que éste se una (Liaw *et al.*, 1995). En la Figura 9 también podemos observar que el $NADP^+$ por si solo estabiliza más a la enzima que cuando además hay Na^+ o Li^+ .

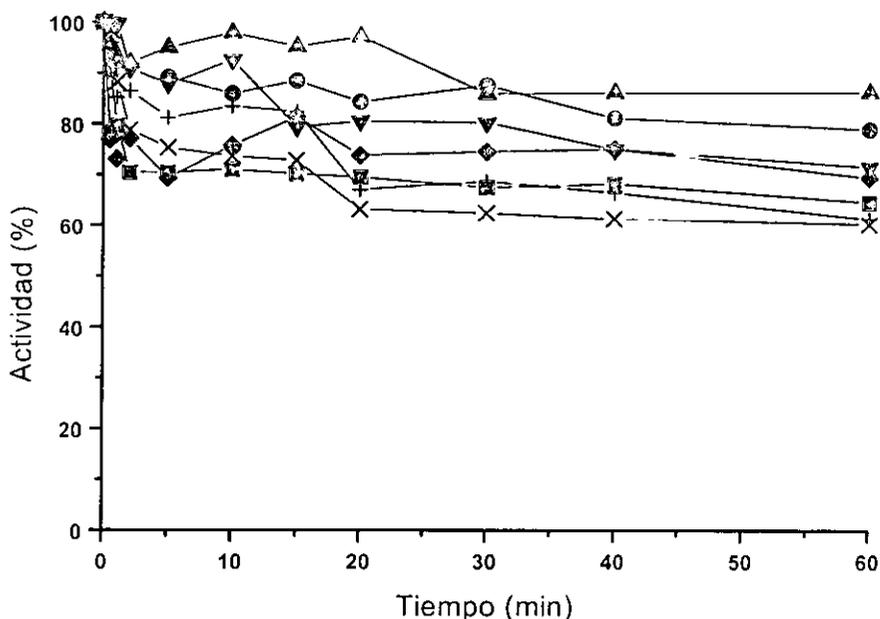


Figura 9. Efecto de los diferentes iones y el $NADP^+$ sobre la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*. La enzima ($36 \mu\text{g/mL}$) fue incubada en un medio que contenía amortiguador Tris-HCl 32 mM , pH 8.0 y $NADP^+$ $500 \mu\text{M}$ (■), o a esta coenzima junto con NH_4Cl (●), KCl (▲), $RbCl$ (▽), $CsCl$ (◆), $LiCl$ (+) ó $NaCl$ (x) a una concentración de 25 mM . La actividad de la enzima fue medida a los tiempos mostrados. El medio de reacción contenía la enzima ($360 \text{ ng}/0.5 \text{ mL}$) proveniente del medio de incubación, amortiguador Tris-HCl 32 mM , pH 8.0 , betaína aldehído 1 mM , $NADP^+$ 0.3 mM y la sal respectiva utilizada en el medio de incubación, a una concentración de 25 mM . La temperatura en el medio de incubación y de reacción fue de 30°C .

Dicho resultado parece tener relación con los efectos contrarios que en ocasiones tiene el sodio sobre enzimas activadas por potasio; así, la DGD de *Pseudomonas cepacia*, que es activada y estabilizada por potasio, es poderosamente inhibida por sodio y litio (Hohenester *et al.*, 1994), mientras que en muchas otras enzimas que son activadas por potasio, el sodio falla en activarlas, tal es el caso de la chaperonina 60 (groEI) que presenta 10 veces menos actividad en presencia de sodio, a diferencia de cuando hay potasio en una concentración equimolar (Viitanen *et al.*, 1990). Hill y Castellino, en 1986, explicaron que el sodio muestra diferencias con otros cationes en la forma en la que actúa sobre la actividad de la amidasa de bovino Des-1-41proteína C (GDAPC). Mientras que para los cationes K^+ , Li^+ , Cs^+ y Ti^+ la gráfica de velocidades iniciales, dependiente de la concentración de cada uno de estos cationes, es hiperbólica, para el Na^+ existe una respuesta sigmoideal. Esto último parece indicar que existe una cooperatividad en la unión sodio. Para la hormona Gpp (NH)p, guanil-5'-il imidodifosfato el orden en que los cationes monovalentes la inhiben es: $Na^+ > Li^+ \gg K^+$ (Hinkle y Kinsella, 1984).

En las Figuras 10, 11 y 12 se muestra el efecto estabilizador de distintas concentraciones de los iones rubidio, potasio y amonio, respectivamente, en presencia de $NADP^+$ 50 μM . A una concentración 200 mM de rubidio (Figura 10) se mantiene el 70 % de la actividad de la enzima, después de 150 min de incubación.

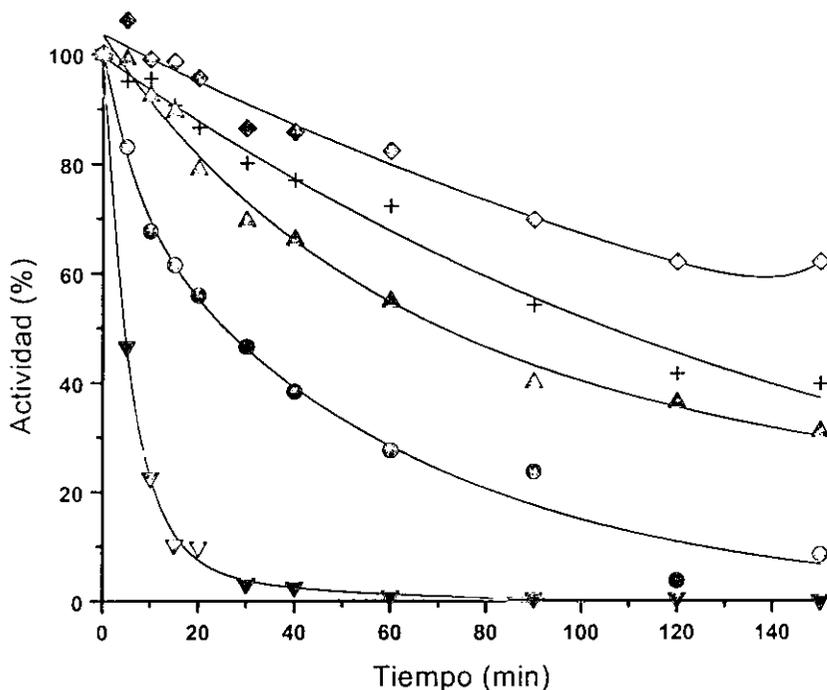


Figura 10. Efecto del rubidio sobre la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*, en presencia de NADP^+ . La enzima ($36 \mu\text{g/mL}$) fue incubada en un medio que contenía amortiguador Tris-HCl 32 mM , $\text{pH } 8.0$, NADP^+ $50 \mu\text{M}$ y RbCl a una concentración de 0 (▼), 25 (●), 50 (▲), 75 (+) y 200 mM (◆). La actividad de la enzima fue medida a los tiempos que se muestran. El medio de reacción contenía la enzima ($360 \text{ ng}/0.5 \text{ mL}$) proveniente del medio de incubación, amortiguador Tris-HCl 32 mM , $\text{pH } 8.0$, betaína aldehído 1 mM , NADP^+ 0.3 mM y RbCl 25 mM . La temperatura en el medio de incubación y de reacción fue de 30°C .

El potasio por su parte (Figura 11), a la concentración y el tiempo de incubación antes mencionados, mantiene un 90% de la actividad. La Figura 12 muestra como el amonio desde bajas concentraciones es capaz de estabilizar a la enzima. En esta figura se observa como a una concentración de 5 mM el ion mantiene un 40 % de actividad enzimática, después de 150 minutos de incubación; a partir de la concentración de 10 mM dicha actividad se mantiene entre un 70 y un 90 %. Esta figura también muestra que la línea de 200 mM se encuentra ligeramente por debajo de la de 75 mM ; dicho resultado se puede relacionar a lo dicho por Evans y Sorger en 1966, quienes explican que las enzimas utilizan potasio y no amonio o rubidio, debido a que estos iones a altas concentraciones pueden ser tóxicos e inhibir a las enzimas.

Ellos también mencionan que el potasio es el único catión monovalente que se encuentra en la naturaleza en cantidades suficientes y con las características adecuadas para satisfacer los requerimientos de la mayoría de las enzimas activadas por cationes monovalentes. Como se describió en la sección anterior los cationes más efectivos para mantener la estabilidad de la enzima *in vitro* son el amonio, el potasio y el rubidio, que tienen un radio iónico y una esfera de hidratación similar (ver Cuadro 2); considerando lo expuesto anteriormente, podemos pensar que *in vivo* el ión activador de la enzima es el potasio, mientras que *in vitro* el amonio resulta ser un eficaz imitador de dicho ión.

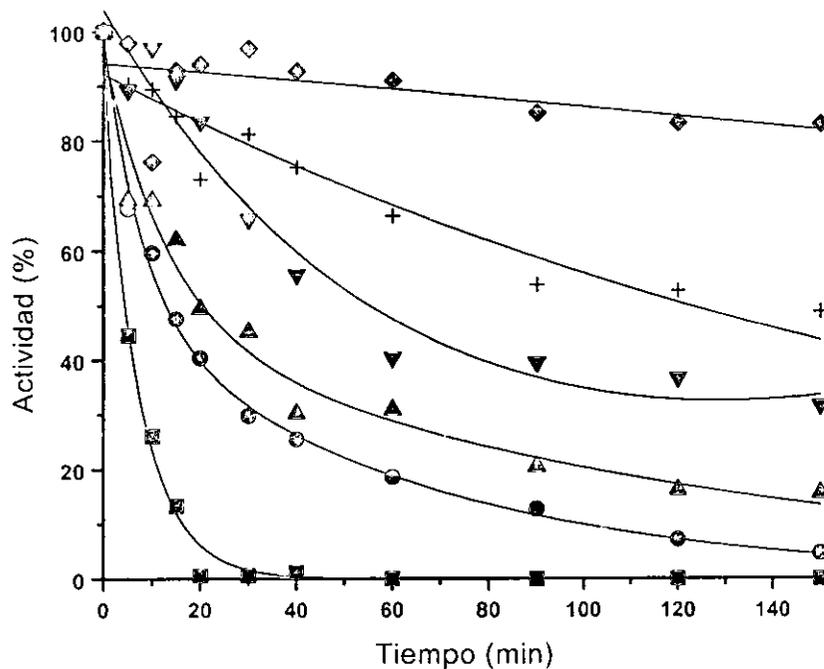


Figura 11. Efecto del potasio sobre la estabilidad de la BADH de *P aeruginosa*, en presencia de NADP^+ . La enzima ($36 \mu\text{g/mL}$) fue incubada en un medio que contenía amortiguador Tris-HCl 32 mM , $\text{pH } 8.0$, NADP^+ $50 \mu\text{M}$ y KCl a una concentración de 0 (■), 25 (●), 50 (▲), 75 (▼), 100 (+) y 200 mM (◆). La actividad de la enzima fue medida a los tiempos que se muestran. El medio de reacción contenía la enzima ($360 \text{ ng}/0.5 \text{ mL}$) proveniente del medio de incubación, amortiguador Tris-HCl 32 mM , $\text{pH } 8.0$, betaina aldehído 1 mM , NADP^+ 0.3 mM y KCl 25 mM . La temperatura en el medio de incubación y de reacción fue de 30°C .

Es sabido que la sustitución de un ión por otro provoca cambios en la estructura de las enzimas. Toney y colaboradores, en 1993, demuestran que la estructura del sitio activo de la diacil glicina descarboxilasa (DGD) unida a Na^+ o a Li^+ es diferente a cuando esta unida a iones más grandes, como K^+ o Rb^+ . En 1994 Hohenester *et al.*, concluyen que la estructura activa o inactiva de la DGD es dependiente del ion al que esta unida. Por otra parte, Xiang y colaboradores, en 1996, sugieren que la unión de iones con diferente radio iónico puede causar cambios conformacionales en la inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH) tipo II de humano; a su vez, se ha visto que en la triptofano sintasa bacteriana, los cationes monovalentes funcionan como el interruptor que transforma a la enzima de una conformación poco activa, tipo I, a una altamente activa, tipo II (Ruvinov *et al.*, 1995). Por su parte McQueney y Markham, en 1995, mencionan que el tamaño

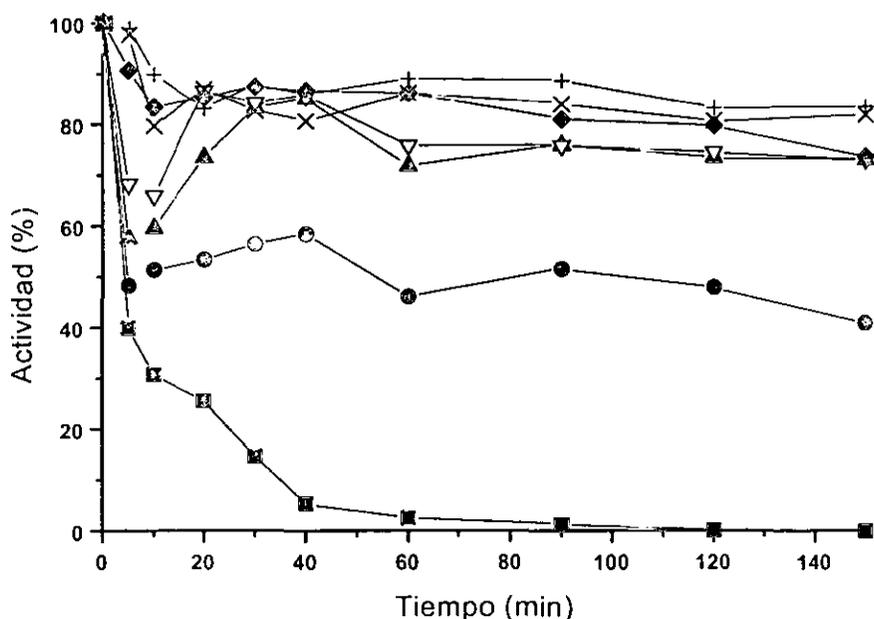


Figura 12. Efecto del amonio sobre la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*, en presencia de NADP^+ . La enzima ($36 \mu\text{g}/\text{mL}$) fue incubada en un medio que contenía amortiguador Tris-HCl 32 mM , $\text{pH } 8.0$, NADP^+ $50 \mu\text{M}$ y NH_4Cl a una concentración de 0 (■), 5 (●), 10 (▲), 25 (▽), 50 (◆) 75 (+) y 200 mM (x). La actividad de la enzima fue medida a los tiempos que se muestran. El medio de reacción contenía la enzima ($360 \text{ ng}/0.5 \text{ mL}$) proveniente del medio de incubación, amortiguador Tris-HCl 32 mM , $\text{pH } 8.0$, betaina aldehído 1 mM , NADP^+ 0.3 mM y NH_4Cl 25 mM . La temperatura en el medio de incubación y de reacción fue de 30°C .

del catión es el que dicta como se une y el grado en que es activa la s-adenosilmetionina sintetasa de *E. coli*.

Una de las características más importantes que aportan los cationes para la activación de las enzimas es el efecto electrostático. Ahmad *et al.*, en el 2001, hablan de que la proteína glucosa oxidasa (GOD) de *Aspergillus niger* presenta repulsión entre sus residuos cargados negativamente, lo que mantiene a la enzima en una conformación "abierta"; así, la interacción con cationes monovalentes con esas cargas negativas presentes en la enzima puede ayudar a compensar el déficit de residuos básicos de ésta, resultando en el debilitamiento de la fuerza de repulsión que se da entre los residuos negativos y permitiendo que la carga positiva funcione como una fuerza que favorece la compactación de la enzima.

Para conocer si las diferencias en la estabilidad de la BADH, mostradas en las figuras anteriores, se relacionaban con diferencias en la estructura de la enzima, promovidas por ausencia o presencia de alguno(s) de los cationes, se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia de la enzima bajo distintas condiciones de inactivación.

En la Figura 13 se muestran los cambios que hay en los espectros de la BADH, luego de 10 minutos de haberla incubado en un medio que únicamente tenía amortiguador tris. La figura muestra un aumento en la fluorescencia (de 170 a 250 unidades) y un corrimiento del pico de máxima emisión (de 335 a 338 nm). La emisión a esta longitud de onda es característico de un triptófano localizado en el interior de la estructura proteica (tipo I) (Strasser *et al.*, 1998).

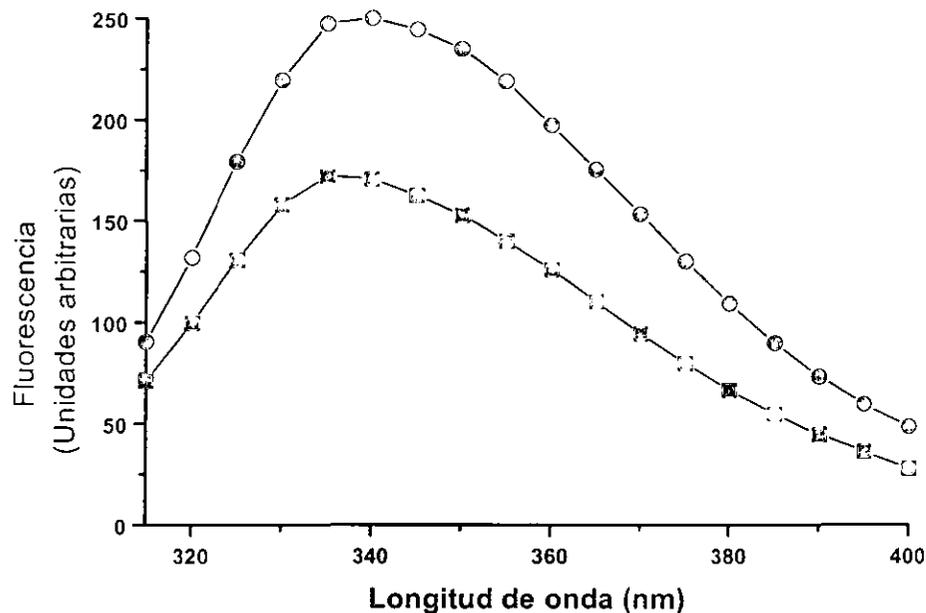


Figura 13. Espectros de emisión de fluorescencia de la BADH de *P. aeruginosa* incubada con amortiguador Tris-HCl. La enzima (36 $\mu\text{g/mL}$) fue incubada en amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0, durante 0 (\blacksquare) y 10 minutos (\bullet). La temperatura de incubación fue de 30°C.

En la Figura 14 se presenta el espectro de la enzima incubada en presencia de NADP 50 μM . Se puede notar que a los diez minutos de incubación también hay un incremento en la intensidad, pero no cambia la longitud de onda a la que se da el pico de máxima emisión, además de que la intensidad de los espectros es menor con respecto a la que presentan los de la figura 13; esta disminución puede explicarse por una transferencia de energía del triptofano al nucleótido unido (Forster, 1948).

Un cambio en la intensidad en los espectros de fluorescencia es el reflejo del ambiente al que está expuesto el o los residuos responsables de dicha fluorescencia (Gershenson *et al.*, 2000). En las proteínas, la proximidad, la especificidad geométrica o la polaridad local pueden aumentar la habilidad que tienen algunos residuos para "apagar" la fluorescencia emitida por otros; por ejemplo, los ácidos glutámico, aspártico, serina, treonina, metionina y arginina pueden aumentar o reducir este apagamiento de acuerdo a su proximidad y

orientación (Yu y Barkley, 1998). Relacionado con esto se ha observado que el decremento en la intensidad de emisión entre la apo y la holoenzima de la O-acetil serina sulfidrilasa (OASS) de *S. typhimurium* esta asociada con la transferencia de energía entre el Trp 50 y la coenzima; dicha transferencia es regida por la distancia que hay entre ellos durante el plegamiento y desplegamiento de la enzima (Benci *et al.*, 1999). Así, se ha visto que al romper los puentes disulfuro de la tioredoxina de *E. coli*, que mantienen cerca a los "cuencheadores" del triptofano, la fluorescencia incrementa; esto parece deberse a que dichos "cuencheadores" se alejan (Slaby *et al.*, 1996).

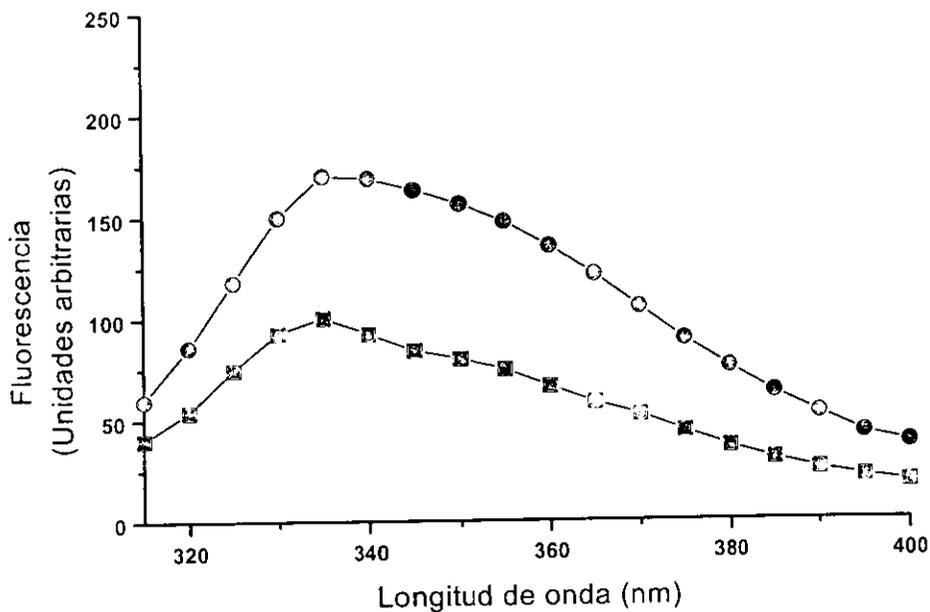


Figura 14. Espectros de emisión de fluorescencia de la BADH de *P. aeruginosa* incubada con NADP⁺. La enzima (36 µg/mL) fue incubada en amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0 y NADP⁺ 50 µM durante 0 (■) y 10 minutos (●). La temperatura de incubación fue de 30°C.

Por lo general, los cambios en fluorescencia, encontrados en la literatura son de disminución (o apagamiento) en la intensidad; aunque en menor número, también existen trabajos que hablan de un incremento en la fluorescencia, como ocurre cuando hay una agregación de la malato deshidrogenasa de citoplasma de

la corteza adrenal de bovino (Senkevich *et al.*, 1987); una activación, como la de las aminoreductasas microsomales de pulmón (Lizcano *et al.*, 2000); un replegamiento, como el de la endorramnosidasa de la cola del fago P₂₂ (Fan *et al.*, 1997) o una inactivación, como la que se presenta en la fenilalanina hidroxilasa de mamífero (Knappskog y Martínez, 1997). En ocasiones este incremento en la intensidad de los espectros se debe a la desnaturalización de las proteínas. Uno de estos casos es el de la triosa fosfato isomerasa de humano (hTIM), la que al ser desnaturalizada por urea o por calor presenta un corrimiento de su pico de máxima emisión hacia el rojo y un incremento en la intensidad de la fluorescencia (Mainfroid *et al.*, 1996). Otra enzima que presenta una respuesta similar es la tiorredoxina de *E. coli*, en la que el efecto del hidrocioruro de guanidina (un agente desnaturalizante) produce un incremento en la fluorescencia de hasta 5 veces, con un corrimiento del pico de máxima emisión de 345 a 356 nm, lo que indica un desplegamiento de la proteína (Slaby *et al.*, 1996). En el caso de la fenilalanina hidroxilasa de mamífero, que presenta actividad como tetrámero, el aumento de pH desde 7 hasta 9 la disocia en dímeros y la inactiva, provocando también un aumento en la fluorescencia y un corrimiento del pico de máxima emisión de 337 a 347 nm (Knappskog y Martínez, 1997). Por otro lado, Kleppe *et al.*, en 1999, observan un incremento en la fluorescencia de la fenilalanina hidroxilasa de humano cuando es desnaturalizada con urea, además de un corrimiento de 2 nm hacia el rojo en su pico de máxima emisión. La glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium* también presenta un aumento en la fluorescencia cuando la enzima es desnaturalizada con urea (Mendoza-Hernandez *et al.*, 2000).

Los cambios del pico de máxima emisión son el reflejo del grado de exposición del triptofano al solvente, es decir, cambios en la polaridad de su microambiente. Así, el corrimiento hacia el azul en el espectro de la holoenzima de la O-acetil serina sulfidrilasa de *Salmonella typhimurium* (LT-2), con respecto al espectro de su apoenzima, es dado por la presencia de un microambiente menos polar al que quedan expuestos los triptofanos (Benci *et al.*, 1999); por el contrario, un cambio en el pico de máxima emisión de 405 a 408 nm es el reflejo de una mayor exposición del triptofano al solvente, hablando de esta misma enzima

(Strambini *et al.*, 1996). De acuerdo a esto, el incremento en la fluorescencia de la BADH parece deberse a un distanciamiento de los "cuencheadores" del o los triptofanos responsables de la emisión, mientras que el corrimiento del pico de máxima emisión hacia el rojo del espectro parece ser resultado de un cambio en la polaridad del microambiente de los triptofanos que emiten la fluorescencia. En la Figura 15 se puede observar que cuando utilizamos 25 mM de los iones amonio (15A) o potasio (15C) el incremento en la fluorescencia a los 10 min de incubación es mínima. Los resultados encontrados son compatibles con los obtenidos por Dickinson y Haywood en 1987, quienes observan que la aldehído deshidrogenasa de *S. cerevisiae*, que es activada por potasio, no presenta cambios en su pico de máxima emisión en presencia de 100 mM de KCl, lo que demuestra que no hay cambios estructurales importantes cuando el ion esta presente. Con base en esto, podemos decir que a una concentración de 25 mM el amonio y el potasio estabilizan la estructura de la enzima, en comparación al efecto que tiene el NADP⁺ 50 μM (Figura 14). Las Figuras 15B y 15D muestran los espectros de fluorescencia de la enzima en presencia de amonio y NADP⁺ o potasio y NADP⁺, respectivamente. Estos resultados se relacionan con los mostrados en las figuras 6, 7 y 8; es decir, la enzima conserva la estabilidad estructural y se mantiene activa en presencia de NADP y amonio o potasio. Es necesario que estén presentes tanto el catión como el NADP⁺ para que la enzima sea estable y activa.

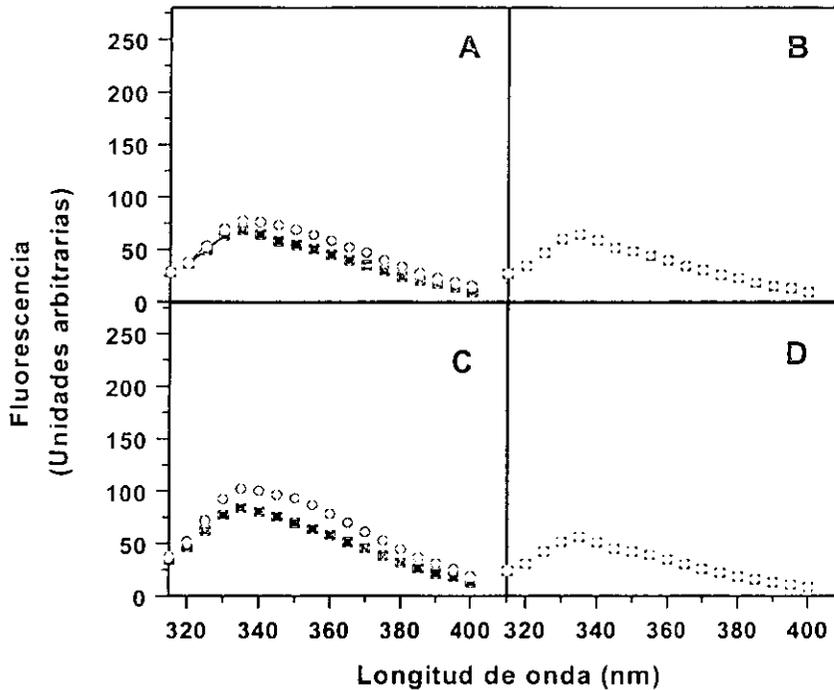


Figura 15. Espectros de emisión de fluorescencia de la BADH de *P. aeruginosa* incubada con NH_4Cl o KCl , en ausencia o presencia de NADP^+ . La enzima ($36 \mu\text{g/mL}$) fue incubada con NH_4Cl (A), $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NADP}^+$ (B), KCl (C) y $\text{KCl} + \text{NADP}^+$ (D), durante 0 (■) y 10 minutos (○). La concentración del NADP^+ y de cada una de las sales fue de $50 \mu\text{M}$ y 25mM , respectivamente. El medio contenía además amortiguador Tris-HCl 32mM , pH 8.0. La temperatura de incubación fue de 30°C .

La Figura 16 muestra el efecto del amonio y el potasio, solos o en combinación con NADP^+ $50 \mu\text{M}$. A diferencia del experimento de la Figura 15, aquí se utilizó una concentración de 200mM para ambos iones; se puede observar que a esta concentración de potasio la enzima presenta una baja emisión, que se asemeja a la que muestra la enzima en la Figura 15D, en presencia de 25mM del ión y $50 \mu\text{M}$ de NADP^+ ; estos resultados también coinciden con los de la Figura 11, en donde se observa que a mayor concentración de potasio la enzima presenta mayor estabilidad.

El amonio acompañado por NADP presenta una emisión similar a la que el potasio logra por si solo, mientras que el amonio a esta concentración y sin NADP , produce un importante incremento en la fluorescencia. En la Figura 16 también se

observa que el amonio, a una concentración de 200 mM, produce un aumento considerable en el pico de emisión de la enzima incubada durante 10 minutos. Incluso acompañado por NADP^+ , la emisión que produce la enzima con amonio 200 mM no llega a tener el bajo valor de emisión encontrado en presencia de 25 mM de amonio (Figura 15A). Esto esta relacionado con lo que se observó en la Figura 12, donde la concentración de 75 mM de amonio, mantiene una mayor actividad que la de 200 mM y con algunos resultados obtenidos durante este trabajo, donde se encontró que un incremento en la concentración de amonio, representa un aumento en la emisión de fluorescencia (datos no mostrados). Sin embargo, no concuerda con lo que se observa en la figura 7, donde el amonio a 200 mM mantiene un 40 % de la actividad de la enzima luego de 60 minutos de incubación.

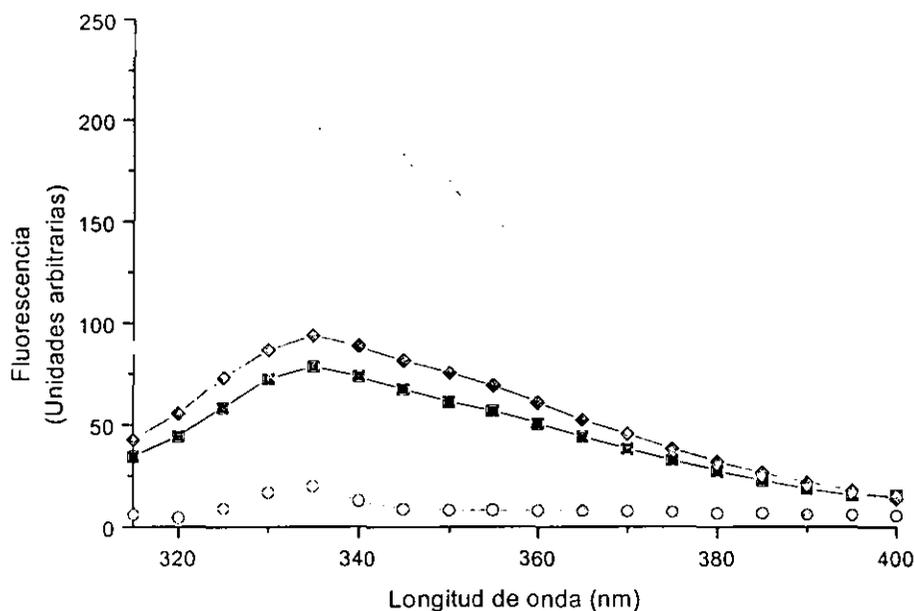


Figura 16. Espectros de emisión de fluorescencia de la BADH de *P. aeruginosa* incubada con KCl o NH_4Cl , en presencia o ausencia de NADP^+ . La enzima ($36 \mu\text{g/mL}$) fue incubada durante 10 minutos con KCl^+ + NADP^+ (●), KCl (■), NH_4Cl + NADP^+ (◆) o NH_4Cl (▲). Las concentraciones utilizadas para el NADP^+ y cada una de las sales fueron $50 \mu\text{M}$ y 200mM , respectivamente. El medio contenía además amortiguador Tris-HCl 32mM , pH 8.0. La temperatura de incubación fue de 30°C .

Esta diferencia puede ser causada por que quizás una alta concentración de amonio produce un cambio conformacional que no inactiva a la enzima.

En la Figura 17 se comparan los espectros de fluorescencia de la enzima incubada durante 10 minutos sin ión alguno o en presencia de cada uno de ellos (25 mM); en esta figura se observa el siguiente orden en la intensidad de los espectros: $K^+ < NH_4^+ < Rb^+ < Li^+ = Cs^+ < Na^+ <$ ningún ión. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en las figuras 8 y 9, donde vemos que la enzima es más estable al ser incubada con K^+ , NH_4^+ o Rb^+ que con Cs^+ , Li o Na^+ , además de que comprueba que la condición en que la enzima tiene una máxima emisión (un mayor cambio en su conformación) es cuando no están ni el catión ni la coenzima.

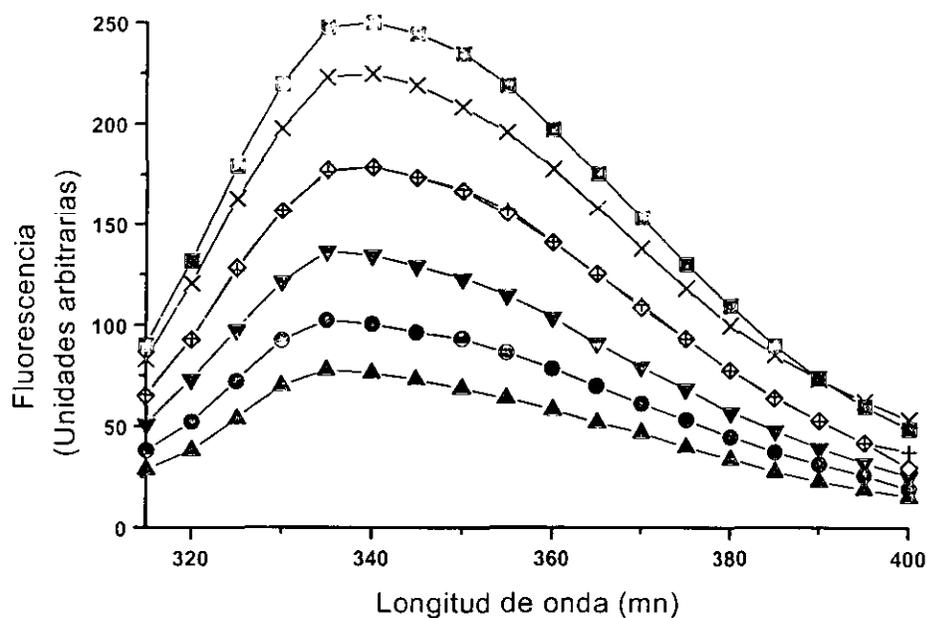


Figura 17. Espectros de emisión de fluorescencia de la BADH de *P. aeruginosa* incubada con diferente catión. La enzima (36 $\mu\text{g/mL}$) fue incubada durante 10 minutos en ausencia de algún catión (■), o en presencia de NaCl (x), LiCl (+), CsCl (◆), RbCl (▼), $NH_4\text{Cl}$ (●) y KCl (▲) 25 mM. El medio contenía además amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0. La temperatura de incubación fue de 30°C.

También se observa que los picos de máxima emisión de la enzima en presencia de Cs^+ , Li^+ , Na^+ o sin catión alguno, se da a 338 nm, mientras que con K^+ , NH_4^+ y Rb^+ se presentan en 335 nm. Esto parece indicar que en presencia de los tres primeros cationes, o únicamente con el amortiguador, el sitio donde se localiza el o los triptofanos que emite(n) se vuelve más polar.

En los espectros de la Figura 18, la enzima también está en presencia de 25 mM de cada uno de los iones, pero esta vez además hay NADP 50 μM ; también se muestra un espectro de la enzima únicamente con NADP⁺. En esta figura el orden de los espectros, de acuerdo a su intensidad, es el siguiente: NH_4^+ < ó = K^+ < Rb^+ < Cs^+ < NADP⁺ < Li^+ < Na^+ . Llama la atención que en presencia de la coenzima (sin catión) la enzima tenga menor emisión que cuando además están el Na^+ ó el Li^+ . Este resultado se relaciona al que se discutió en la Figura 8: el NADP⁺ solo es mejor para mantener la actividad de la enzima que junto con el ión sodio.

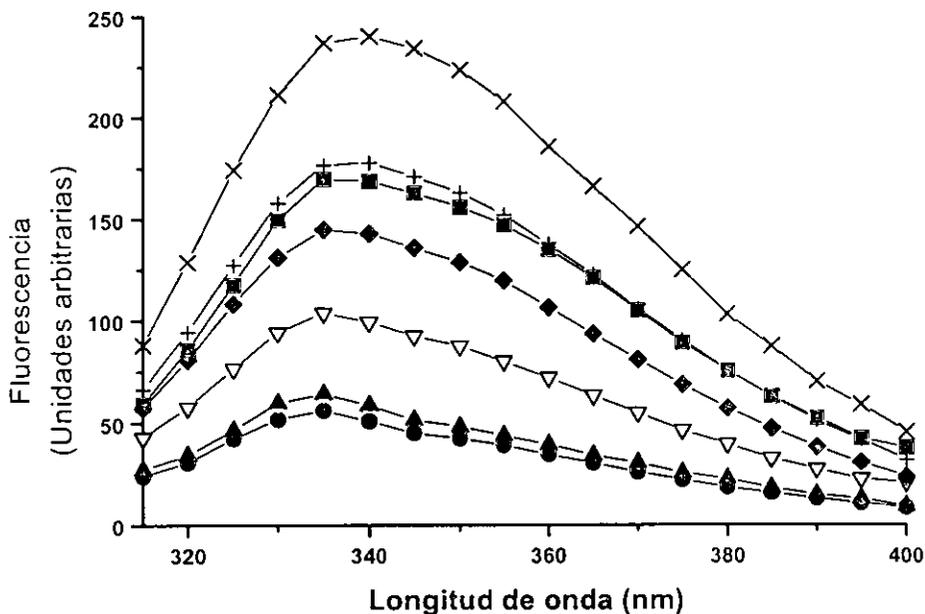


Figura 18. Espectros de emisión de fluorescencia de la BADH de *P. aeruginosa* incubada con diferente catión, en presencia de NADP⁺. La enzima (36 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fue incubada durante 10 minutos con $\text{NaCl} + \text{NADP}^+$ (x), $\text{LiCl} + \text{NADP}^+$ (+), $\text{CsCl} + \text{NADP}^+$ (◆), $\text{RbCl} + \text{NADP}^+$ (∇), $\text{KCl} + \text{NADP}^+$ (▲), y $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NADP}^+$ (●). También se muestra el espectro de la enzima incubada únicamente con NADP⁺ (■). Las concentraciones utilizadas para el NADP⁺ y cada una de las sales fueron 50 μM y 25 mM, respectivamente. El medio contenía además amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0. La temperatura de incubación fue de 30°C.

En la Figura 18 también se observa que todos los espectros (excepto los del Na^+ y el Li^+) tienen su pico de máxima emisión a 335 nm, lo que sugiere que en presencia de estos dos últimos cationes el NADP^+ no evita que los triptofanos sean expuestos a un ambiente más polar.

Una vez que se determinó que existía relación entre la pérdida de actividad enzimática y el incremento en el pico de emisión del triptofano, lo que sugería que la inactivación encontrada era el resultado de un cambio en la conformación de la proteína; además, con base en los trabajos en donde se señala que los incrementos en la fluorescencia del triptofano están relacionados con la formación de agregados (Senkevich *et al.*, 1987 y Mendoza-Hernandez *et al.*, 2000) se decidió realizar experimentos de entrecruzamiento de la proteína mantenida durante 60 minutos bajo condiciones estables (con NH_4^+ o K^+ y NADP^+) o inestables (únicamente con el amortiguador Tris-HCl). Después de estos 60 minutos, la proteína se fijó con glutaraldehído, como se explica en la metodología. Los resultados se muestran en la Figura 19. En ella se observa que la masa molecular de la proteína sin entrecruzar (carril 1), es de aproximadamente 61 kDa. Se ha demostrado que dicha masa es en realidad menor (53 kDa), pero que se sobrestima cuando se determina por electroforesis en gel de acrilamida con SDS (Velasco-García, 2000), al igual que pasa con la enzima de *Amaranthus hypochondriacus* (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). En el carril 2 se observa la enzima entrecruzada con glutaraldehído en presencia de amortiguador de fosfatos, en el que se mantiene estable la enzima. Se pueden observar 3 bandas: la primera de 159 kDa, que corresponde al dímero, el cual se ha propuesto como unidad fundamental de agregación para la enzima (Velasco *et al.*, 1999); la segunda de 65 kDa, que corresponde a la subunidad y la tercera de 52 kDa, que parece ser resultado de un entrecruzamiento intrasubunidad. En los carriles 3 y 4, donde la enzima fue incubada con potasio y amonio 25 mM, respectivamente, en presencia de NADP^+ 50 μM , aparecen las mismas bandas (159, 65 y 52 kDa), junto con otras que se observan a la entrada de los geles separador y concentrador, con una masa molecular superior a la que tienen los marcadores utilizados. Esto último parece indicar la presencia de una parte de la

proteína en forma de agregados. En el carril 5, que corresponde a la enzima completamente inactiva (amortiguador Tris-HCl únicamente), vuelven a aparecer las mismas bandas (159, 65 y 52 KDa), pero en baja cantidad, a pesar de que en todos los carriles se puso la misma cantidad de proteína.

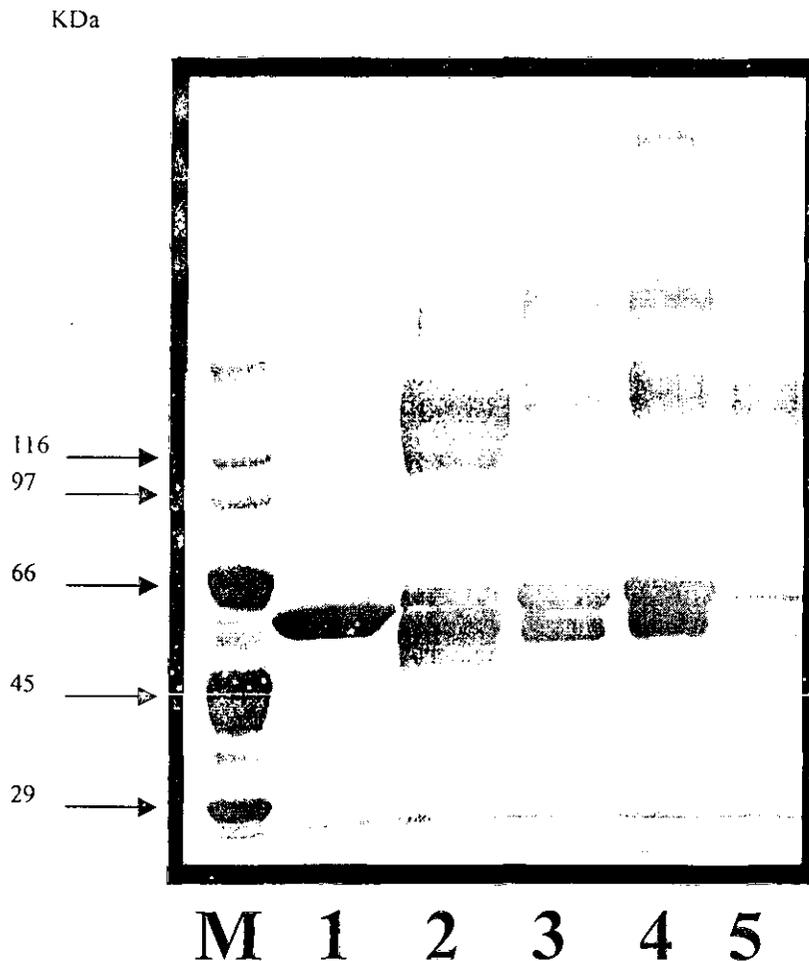


Figura 19. Entrecruzamiento de la BADH de *P. aeruginosa* bajo diferentes condiciones de estabilidad. El carril 1 muestra la proteína sin entrecruzar. Del carril 2 al 5 se presenta la enzima sometida a entrecruzamiento con glutaraldehído, pero que previamente fue incubada durante 60 minutos con el amortiguador de fosfato de potasio 100 mM, pH 8.0 (carril 2), con el amortiguador Tris-HCl 32 mM, pH 8.0 (carril 5) o con este último amortiguador y en presencia de $\text{NH}_4\text{Cl} + \text{NADP}^+$ (carril 3) o de $\text{KCl} + \text{NADP}^+$ (carril 4). La concentración de la enzima sometida a incubación en los diferentes medios fue de 527 $\mu\text{g}/\text{mL}$; la cantidad de proteína que se aplicó en cada carril fue de 5.26 μg . El NADP^+ se utilizó a una concentración de 50 μM y las sales de amonio y potasio a 25 mM. M= marcadores de peso molecular. Para mayor detalle ver "Experimentos de entrecruzamiento" en la sección de metodología.

Cabe mencionar que se descarta la posibilidad de que este resultado se deba a un artefacto de la tinción, debido a que este experimento se repitió en varias ocasiones tiñendo con plata y con azul de coomassie, obteniéndose en todas ellas el mismo resultado. La "desaparición" de la proteína, podría explicarse por la formación de agregados de mayor tamaño que no pueden entrar al gel concentrador y que durante el proceso de fijación son lavados de éste.

Para corroborar si esta suposición de formación de agregados inactivos era cierta, la enzima fue sometida a un análisis de dispersión dinámica de luz, que determina el coeficiente de difusión de las moléculas y a partir de éste, su radio hidrodinámico y el peso molecular. Los resultados se muestran en la Figura 20 y en el Cuadro 3.

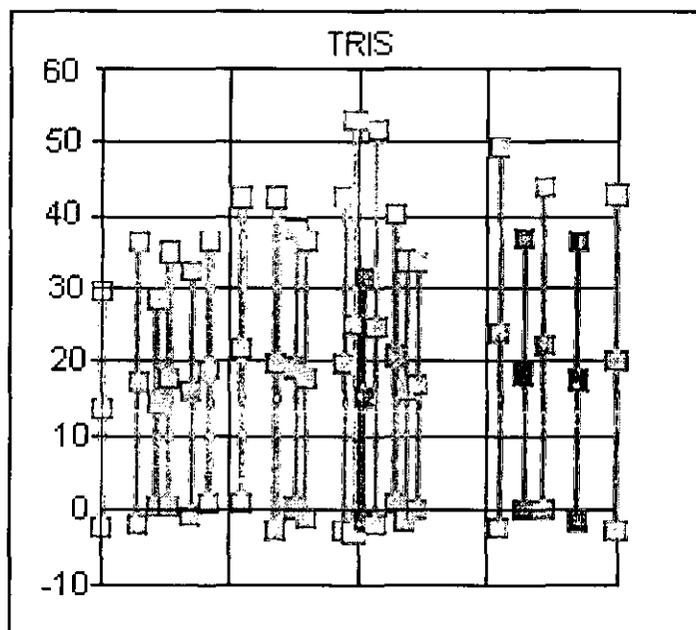


Figura 20. Efecto del amortiguador tris sobre la agregación de la BADH de *P. aeruginosa*. Se observa la aparición de diferentes especies de agregados a lo largo del análisis de dispersión dinámica de luz de la enzima (64 µg/mL).

Cabe mencionar que el peso del dímero de la enzima es de 109 KDa, y que en el análisis de dispersión dinámica de luz, el peso que se encontró en las condiciones más estables (NH_4^+ + NADP^+ 500 µM), fue de 6000 KDa, es decir, alrededor de 55 dímeros unidos. Este resultado es difícil de explicar, sin embargo podemos mencionar que existen enzimas que son activas en forma de agregados,

como ocurre con tres celulasas de hepatopancreas de *Halotis fulgens* (abulon azul). (Hernández-Santoyo *et al.*, 2000). No obstante, se puede observar que en estas condiciones de mayor estabilidad no cambia el peso molecular del agregado enzimático a lo largo del tiempo (ver Cuadro 3), mientras que cuando la enzima se encuentra en condiciones inactivantes (únicamente Tris-HCl) hay un incremento en el tamaño de los agregados, con respecto al tiempo (Figura 20).

Lectura	Tris		NH ₄ ⁺ +NADP ⁺		% Masa
	Tiempo (Seg)	MW(KDa)	Tiempo (seg.)	MW(KDa)	
1	185	3590	0.0	4230	100
2	273	7530	256	3380	100
3	321	4580	452	7400	100
4	347	8290	479	4750	100
5	399	5820	502	3250	100
6	444	9550	529	12900	100
7	523	14900	627	6070	100
8	609	11400	650	6620	100
9	652	10300	699	6970	100
10	680	8270	721	5860	100
11	774	11500	746	11000	100
12	799	22600	766	5420	100
13	822	5080	825	4240	100
14	847	22200	877	3490	100
15	897	12700	905	4680	100
16	922	6210	928	3200	100
17	848	7000	953	4300	100
18	1148	19100	976	4770	100
19	1208	9000	-	-	100
20	1255	15600	-	-	100
21	1336	11800	-	-	100

Cuadro 3. Datos obtenidos durante el análisis de dispersión dinámica de luz de la enzima con el amortiguador tris y con NH₄⁺ + NADP⁺ 500 μM.

Mozhaev y Martinek en 1982, hablaron de que las mayores causas de inactivación de las enzimas son: a) agregación, b) intercambio tiol disulfuro, c) alteración de la estructura primaria (modificación química de grupos funcionales), d) rompimiento de puentes disulfuro, e) disociación del grupo prostetico del centro activo de la enzima, f) disociación de proteínas oligomericas en subunidades y g) cambios conformacionales en la macromolécula. De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo se propone que la BADH pierde su actividad, cuando esta en presencia de tris únicamente o de iones como el sodio, no por que

se disocian sus subunidades, sino porque se forman agregados inactivos de la enzima. Se ha dicho, para otras proteínas, que para que se formen agregados deben haber cambios en su estructura, como la exposición de grupos hidrofóbicos (Uversky *et al.*, 1998), lo que puede explicar los cambios en la fluorescencia encontrados aquí. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Hartleib *et al.*, 2001, quienes al separar el ión activador Ca^{2+} de la enzima diisopropylfluorofosfatasa de *Loligo vulgaris*, encuentran que el desplegamiento de la proteína es acompañada por una agregación. Por su parte Senkevich y colaboradores, en 1987, encuentran que el incremento en la intensidad de la fluorescencia, junto con un pequeño corrimiento del pico de máxima emisión hacia el rojo, están asociados a la agregación de la malato deshidrogenasa de citoplasma de corteza adrenal de bovino.

CONCLUSIONES

1. La enzima BADH de *P. aeruginosa* es activada *in vitro* por todos los cationes monovalentes probados a 25 mM; sin embargo, este efecto fue superior para K^+ y para aquellos iones con un radio iónico similar (NH_4^+ y Rb^+) o ligeramente mayor (Cs^+) al de éste. En presencia de cationes con un radio iónico inferior (Li^+ y Na^+) la activación fue menor.
2. El efecto de los iones sobre la estabilidad de la enzima, en amortiguador tris-HCl, también depende del tamaño del ión, encontrando que dicho efecto se da en el siguiente orden: $NH_4^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Li^+ > Na^+$. El $NADP^+$ también estabiliza a la enzima; no obstante, el uso por separado de esta coenzima o de cualquiera de los iones mencionados, mantienen una baja estabilidad. La mayor estabilidad encontrada, se da en presencia de $NADP^+$ (500 M) y de los iones NH_4^+ y K^+ (25 mM).
3. La inactivación de la enzima parece ser resultado de cambios conformacionales en la proteína, evidenciados por un incremento en la fluorescencia del triptofano y un corrimiento del pico de máxima emisión hacia el rojo. Lo primero podría deberse a la separación entre el triptofano que emite la fluorescencia y un residuo que en la proteína estable recibe dicha energía; el desplazamiento hacia el rojo parece ser debido a cambios en la polaridad del sitio en donde se localiza dicho triptofano. Bajo condiciones de máxima estabilidad ($NADP^+$ y NH_4^+ o K^+) estos cambios no se presentan.
4. Los cambios conformacionales antes mencionados producen, a su vez, agregados proteicos inactivos, los que posiblemente se forman por interacciones entre zonas hidrofóbicas que se exponen durante el proceso de inactivación.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, A., Akahtar, M. y Bhakuni, V. 2001. Monovalent cation-induced conformational change in glucose oxidase leading to stabilization of the enzyme. *Biochemistry*. **40**: 1945-1955.
- Benci, S., Bettati, S., Vaccari, S., Schianchi, G., Mozzarelli, A. y Cook, P. F. 1999. Conformational probes of O-acetylserine sulfhydrylase: fluorescence of tryptophans 50 and 161. *J. Photochem. Photobiol.* **48**: 17-26.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S., y Bremer, E. 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch Microbiol.* **168**: 282-289.
- Bostian, K. A. y Betts, G. F. 1978. Kinetics and reaction mechanism of potassium-activated aldehyde dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **173**: 787-798.
- Boyd, L. A., Adam, L., Pelcher, L. E., McHughen, A., Hinji, R., y Selvaraj, G. 1991. Characterization of an *Escherichia coli* gene 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**: 248-256.
- Brock, D. T. 1978. Biología de los microorganismos. Omega. España. p.p. 116-119.
- Conn, E. E. y Stumpf, P. K. 1991. Bioquímica fundamental. 3ª ed. Limusa, México. p.p. 99-112.
- Choquet, C. G., Ahonkhai, I., y Kushner, D. J. 1991. Formation and role of glycine betaine in the moderate halophile *Vibrio costicola*. *Arch. Microbiol.* :153-158
- Danson, M. J., Hough, D. W., Kurz, L. C., y Mulholland, A. J. 2000. Enzymes from Extremophiles: the Structural Basis of Enzyme Stability and Activity in Extreme Conditions. *E.J.B.*
[wysiwyg://9http://www.ejb.org/feedback/proceedings/04/0ral/di.html](http://www.ejb.org/feedback/proceedings/04/0ral/di.html)
- Day, A. 1996. The Source of Stability in Proteins.
<http://www.crist.bbk.ac.uk/PPS2/projects/day/TdayDiss/index.html>
- Devlin, T. M. 1997. Biochemistry. 4º ed. Wiley-Liss, USA. p.p. 62-69.

Dickinson, F. M., y Haywood, G. W. 1987. The role of the metal ion in the mechanism of the K⁺-activated aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **247**: 377-384.

Evans, H. J. y Sorger, G. J. 1966. Role of mineral elements whit emphasis on the univalent cations. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* **17**: 47-76.

Falkenberg, P. y Stroem, A. R. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1034**: 253-259.

Fan, Z. H., Jensen, P. K., Lee, C. S. y King, J. 1997. Monitoring the refolding pahhway for a large multimeric protein using capillary zone electrophoresis. *J. Cromatography.* **769**: 315-323.

Flores, M. V., Ertola, R. J., y Voget, C. E. 1996. Effect of Monovalent Cations on the Stability and Activity of *Kluyveromyces lactis* β-Galactosidase. AP. 503-506.

Forster, T. 1948. Intramolecular energy transference and fluorecence. *Ann. Phys. (Leipzig)* **2**: 55-75.

Garrett, y Grishman, 1999. Biochemistry. 2° ed. Saunders College Publishing, USA, p.p 426-430.

Gazerro, M. 1997. The factors involved in protein thermostability. <http://www.crist.bbk.ac.uk/pps97/assignments/projects/gazerro/project.html>

Gershenson, A., Schauerte, A. J., Giver, L. y Arnold, F. H. 2000. Tryptophan phosphorescence study of enzyme flexibility and unfolding in laboratory-evolved thermostable esterases. *Biochemistry.* **39**: 4658-4665.

Haney, P. J., Stees, M., y Konisky, J. 1999. Analysis of Thermal Stabilizing Interactions in Mesophilic and Thermophilic Adenylate Kinases from the Genus *Methanococcus*. *J. Biol. Chem.* **274** (40): 28453-28458.

Haney, P., Konisky, J., Koretke, K. K., Luthey-Schulten, Z., y Wolynes, P. G. 1997. Structural Basis for Thermostability and Identification of Potential Active Site Residues for Adenylate Kinases From the Archaeal Genus *Methanococcus*. *P: Structure, Function, and Genetics.* **28**: 117-130.

Hartleib, J., Geschwindner, S., Scharff, E. I. y Ruterjans, A. 2001. Role of calciun ions in the structure and function of the di-isopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*. *Bichem. J.* **353**: 579-589.

Hernandez-Santoyo, A., Rojo-Dominguez, A., Garcia-Hernandez, E. y Rodriguez-Romero, A. 2000. Physicochemical properties and behavior in solution of three cellulases from *Haliotis fulgens*. *Prot. Peptide. Letters.* **7(6)**: 389-396.

Hill, K. A. y Castellino, F. J. 1986. The stimulation by monovalent cations of the amidase activity of bovine Des-1-41 light chain activated protein C. *J. Biol. Chem.* **261(32)**: 14991-14996.

Hinkle, P. M. y Kinsella, P. A. 1984. Regulation of thyrotropin-releasing hormone binding by monovalent cations and guanil nucleotides. *J. Biol. Chem.* **256(6)**: 3445-3449.

Hohenester, E., Keller, J. W. y Jansonius, J. N. 1994. An alkali metal ion size-dependent switch in the active site structure of Dialkylglycine decarboxylase. *Biochemistry.* **33**: 13561-13570.

Horton, H. R., Moran, L. A., Ochs, R. S., Rawn, J. D. y Scrimgerour, K. G. 1996. Principles of Biochemistry. 2nd. Ed. Prentice Hall, p.p. 181-186.

Hurley, T. D. 1992. Crystallization and Preliminary X-ray Investigation of Bovine Liver Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **227**: 1255-1257.

Iannou, M., y Coutsogeorgopoulos, C. 1997. Kinetic Studies on the Activation of Eukaryotic Peptidyltransferase by Potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* **345 (2)**: 325-331.

Jaenicke, R. 1991. Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur. J. Biochem.* **202**: 715-728.

Jaenicke, R. y Bohm, G. 1998. The stability of proteins in extreme environments. *Structural. Biol.* **8**: 738-748.

Jakoby, W. J. 1963. Aldehyde dehydrogenases. En: Boyer, P. D. (ed). The Enzymes, Vol. 7, 2nd ed., Academic Press, New York. pp. 203-221.

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

Kamekura, M. y Kushner, D. J. 1984. Effect of chloride and glutamate ions on *in vitro* protein synthesis by the moderate halophile *Vibrio costicola*. *J. Bacteriol.* **160(1)**: 385-390.

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

Kleppe, R., Uhlemann, K., Knappskog, P. M. y Haavik, J. 1999. Urea-induced denaturation of human phenylalanine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **274(47)**: 33251-33258.

- Knappskog, M. y Martinez, A. 1997. Effect of mutation at Cys237 on the activation state and activity of human phenylalanine hydroxylase. *FEBS*. **409**: 7-11.
- Kumar, S., Ma, B., Tsai, C-J., y Nussinov, R. 2000(b). Electrostatic Strengths of Salt Bridges in Thermophilic and Mesophilic Glutamate Dehydrogenase Monomers. *P. Structure, Function, and Genetics*. **38**: 368-383.
- Kumar, S., Tsai, C-J. y Nussinov, R. 2000. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng.* **13 (3)**: 179-191.
- Kushner, D. J., Hamaide, F., y MacLeod, R. A. 1983. Development of salt-resistant transport in a moderately halophilic bacterium. *J. Bacteriol.* **153(3)**: 1163-1171.
- Laemmli, U., K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Larsen, T. M., Laughlin, L. T., Holden, H. M., Rayment, I. y Reed, G. H. 1994. *Biochemistry*. **33**: 6301-6309.
- Laughlin, L. T. y Reed, G. H. 1997. The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117. *Arch. Biochem. Biophys.* **348(2)**: 262-267.
- Liaw, S., Kuo, I., y Eisenberg, D. 1995. Discovery of the ammonium substrate site on glutamine synthetase, a third cation binding site. *Protein Science*. **4(11)**: 2358-2365.
- Lizcano, J. M., Tipton, K. F. y Unzeta, M. 2000. Time-dependent activation of the semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) from ox lung microsomes. *Bioche. J.* **351**: 789-794.
- Ma, B., Kumar, S., Tsai, C-J., y Nussinov, R. 1999. Folding funnels and Binding mechanisms. *Protein Eng.* **12 (9)**: 713-720.
- Mainfroid, V., Terpstra, P., Beauregard, M., Frere, J., Mande. S. C., Hol, W. G. J., Martial, J. A. y Goraj, K. 1996. Three hTIM mutants that provide new insights on why TIM is a Dimer. *J. Mol. Biol.* **257**: 441-456.
- McQueney, M. S. y Markham, G. D. 1995. Investigation of monovalent cation activation of s-adenosylmethionine synthetase using mutagenesis and uranyl inhibition. *J. Biol. Chem.* **270(31)**: 18277-18284.
- Mendoza-Hernandez, G, Minauro, F. y Rendon, J. L. 1999. Aggregation, dissociation and unfolding of glucose dehydrogenase during urea denaturation. *Biochem. Biophysic. Acta.* **1478**: 221-231.

- Mori, N., Yoshida, N., y Kitamoto, Y. 1992. Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Fermentation and Bioengineering*. **73(5)**: 352-356.
- Mozhaev, V. V. y Martinek, K. 1982. Inactivation and reactivation of proteins (enzymes). *Enzyme. Microb. Technol.* **4**: 299-309.
- Muir, J. M., Russell, R. J., Hough, D. W., y Danson, M. J. 1995. Citrate Synthase from the hyperthermophilic Archaeon, *Pyrococcus furiosus* . *Protein Eng.* **8**: 583-592.
- Nawasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y. y Ogata, K. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde deshydrogenasa from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 1743-1749.
- O'Brien, M. C., y McKay, D. B. 1995. How Potassium Affects the Activity the Molrcular Chaperone Hsc70. I Potassium is required for optimal ATPase Activity. *J. Biol. Chem.* **270(5)**: 2247-2250.
- Pace, C. N. y Grimsley, G. R. 1987. Ribonuclease T1 is stabilized by cation and anion binding. *Biochemistry.* **27**: 3242-3246.
- Park, I. K. y Young, J. Effects of NAD or NADP on the stability of liver and pectoral muscle enzymes in 3-acetylpyridine treated quail by heat and trypsin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**: 1223-1234.
- Pollard, A. y Jones, W.G. 1979. Enzyme Activities in Concentrated Solutions of Glycinebetaine and Other Solutes. *Planta.* **144**: 291-298.
- Querol, E., Perez-Pons, J.A, y Mozo-Villarias, A. 1996. Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Protein Eng.* **9**: 265-271.
- Rafaeli-Eshkol, D. y Avi-Dor, Y. 1968. Studies on halotolerance in a Moderately halophilic bacterium. *Biochem. J.* **109**: 687-691.
- Russell, R. J., Gerike, U., Danson, M. J., Hough, D. W. y Taylor, G. L. 1998. Structural adaptation of the cold-active citrate synthase from an Antartic bacterium. *Structure.* **6**: 351-361.
- Russell, R., Ferguson, J., Hough, D. W., Danson, M. J. y Taylor, G. L.. 1997. The crystal structure of citrate synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry*, **36**: 9983-9994.
- Ruvinov, S. B., Ahmed, S. A., McPhie, P. y Miles, E. W. 1995. Monovalent cations partially repair a conformational defect in a mutant tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ complex (β -E109A). *J. Biol. Chem.* **270(29)**: 17333-17338.

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

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.

Sasse, I. y Callanger, S. R. 1996. Rapid silver staining. Short protocols in molecular biology. p.p. 123.

Senkevich, S. B., Strumilo, S. A., Zavodnik, I. B. y Vinogradov, V. V. 1987. Some kinetic and spectral-fluorescent properties of NADP-dependent malate dehydrogenase from the cytoplasm of the bovine adrenal cortex. *Biokhimiya.* **51(9)**: 1534-1540.

Slaby, I., Cerna, V., Jengs, M., Dysons, H. J. y Holgren, A. 1996. Replacement of Trp²⁸ in *Escherichia coli* thioredoxin by stability but no function. *J. Biol. Chem.* **271(6)**: 3091-3096.

Smith, J.J., Travis, M.S. y Greenberg, P.E. 1996. Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria Because of Abnormal Airway Surface Fluid. *Cell.* **85**: 229-236.

Sorger, G. J. y Evans, H. J. 1966. Effects of Univalent Cations on the Properties of Yeast NAD⁺ Acetaldehyde Dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta.* **118**: 1-8.

Strabini, G. B., Cioni, P. y Cook, P. F. 1996. Tryptophan luminescence as a probe of enzyme conformation along the O-acetylserine sulfhydrylase reaction pathway. *Biochemistry.* **35**: 8392-8400.

Strasser, F., Dey, J., Eftink, R. y Plapp, B.V. 1998. Activation of horse liver alcohol dehydrogenase upon substitution of tryptophan 314 at the dimer interface. *Arch. Biochem and Biophys.* **358**: 369-376.

Suelter, C. H. 1970. Enzymes activated by monovalent cations. *Sci.* **168**: 789-795.

Toney, M. D., Hohenester, E., Cowan, S. W., y Jansonius, J. N. 1993. Dialkylglycine Decarboxylase Structure: Bifunctional Active Site and Alkali Metal Sites. *Science.* **261**: 756-759.

Tsai, C. J. y Nussinov, R. 1997. Hydrophobic Folding units derived from dissimilar monomer structures and their interactions. *Protein Sci.* **6(1)**: 24-42.

Uversky, V. N., Karnoup, A. S., Segel, D. J., Seshadri, S., Doniach, S. y Fink, A. L.. 1998. Anion-induced folding of *Staphylococcal* nuclease: characterization of multiple equilibrium partially folded intermediates. *J. M. B.* **278**: 879-894.

Valenzuela-Soto, E. M. y Muñoz-Clares, R. A. 1993. 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.

Velasco-García, R. 2000. Purificación y caracterización de betaina aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. p.p. 28-106.

Velasco-García, R., Gonzales-Segura, L. y Muñoz-Clares, R. 2000. Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁻ and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **352**: 675-683.

Velasco-García, R., Mújica-Jimenez, C., Mendoza-Hernandez, G., y Muñoz-Clares, R. A. 1999. Rapid Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181(4)**: 1292-1300.

Viitanen, P. V., Lubben, T. H., Reed, J., Goloubinoff, P., O'Keefe, D. P. y Lorimer, G. H. 1990. Chaperinin-facilitated refolding of ribulosebiphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are K dependent. *Biochemistry.* **29**: 5665-5671.

Voet, D., y Voet, J. G. 1995. *Biochemistry*. 2nd.ed. John Wiley and Sons. Inc. USA. p.p. 191-205.

Vogt, G. y Argos, P. 1997. Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing?. *Fold Des.* **2(40)**: 540-546.

Wilbanks, S. M., y McKay, D. B. 1995. How Potassium Affects the Activity the Molecular Chaperone Hsc70. II Potassium binds specifically in the ATPase active site. *J. Biol. Chem.* **270(5)**: 2251-2257.

Wu, T. y Scrimgeour, K. G. 1973. Properties of inosinic acid dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Can. J. Biochem.* **51**: 1391-1398.

Xiang, B., Taylor, J. C., y Markham, G. D. 1996. Monovalent Cation Activation and Kinetic Mechanism of Inosine 5'- Monophosphate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **271(3)**: 1435-1440.

Xu, D., Tsai, C-J. y Nussinov, R. 1997. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein Eng.* **10 (9)**: 999-1012.

Yip, K. S., Britton, K. L., Stillman, T. J., Lebbink, J., DeVos, W. M., Robb, F. T., Vetriani, C., y Maeder, D. 1998. Insights into the molecular basis of thermal stability from the analysis of ion-pair networks in the GluDH family. *Eur. J. Biol.* **255**: 336-346.

Yu, C. y Barkley, D. M. 1998. Toward understading tryptophan fluorescece in proteins. *Biochemistry*. **37**: 9976-9982.