

00551
5



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA BETAÍNA
ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE HOJA DE
AMARANTO INDUCIDA POR SUS LIGANDOS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A :
LILIA IVONNE CONTRERAS DÍAZ

Tutora: ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES



MÉXICO, DF.

Noviembre 2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:
Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares Facultad de Química, UNAM
Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez Facultad de Medicina, UNAM

Se reconoce la asesoría técnica del Biól. Carlos Mújica Jiménez en los experimentos de filtración en gel.

El proyecto fue apoyado por DGAPA IN221001. Durante los estudios de Maestría goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado en Noviembre de 2003

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:
Presidente Dra. Marietta Tuena de Gómez-Puyo Instituto de Fisiología, UNAM
Vocal Dr. Mario Luis Calcagno Montans Facultad de Medicina, UNAM
Secretario Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez Facultad de Medicina, UNAM
Suplente Dr. Rogelio Rodríguez Sotres Facultad de Química, UNAM
Suplente Dra. Georgina Garza Ramos Facultad de Medicina, UNAM

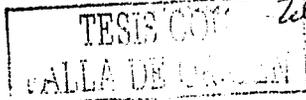
Asesora:

Dra. Rosario A. Muñoz Clares Rosario A. Muñoz Clares

Sustentante:

Biól. Lilia I Contreras Díaz Lilia I Contreras

Ante el Comité de Examen de Maestría
UNAM - Facultad de Química
Conjunto E - Laboratorio 102
México, D.F.
Lilia I Contreras Díaz
17 nov 2003
Lilia Contreras



Mi mas profundo y sincero agradecimiento a todos y cada una de las personas e instituciones que intervinieron en la realización y conclusión de este trabajo:

Dra. Rosario Muñoz
Dr. Alejandro Fernández
Dr. Juan Pablo Pardo
Dra. Marietta Tuena
Dra. Georgina Garza
Dr. Rogelio Rodríguez
Dr. Mario Calcagno
Biol. Carlos Mujica
Sra. ~~dece~~ Leticia Lety García
Compañeros del Laboratorio
y de clases
UNAM ...

TESIS CON
ALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

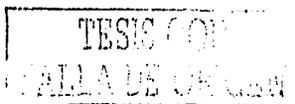
Esta es la parte mas difícil de la Tesis, ya que uno se tiene que acordar hasta de los muertos. No se ofendan todos aquellos que no están en la lista (señor de los bocadillos, por ejemplo), simplemente es mero descuido. Esta línea es para ti que te tomas la molestia de hojear esta tesis

Pues va pa' toda la banda ya saben Dios nos hace y nosotros nos encargamos de juntarnos:

Los viejos: Nancy-Magda; los menos viejos: Joel-Vladis y su mujer (claro!!!), Fer-y los que fueron grandes amigos (los omitidos); los nuevitos: Sandra-Miguel, Sergio-Carlos, Ángela.... (no tienes pareja) y Llarahí-y los que vengan (todo se lo debo a mi manager).

La familia claro nunca se olvida *Papá, Mamá, hermano* (negrito) y *hermanitas* (Gordita, Vero y Pinpon, ya saben estos también vienen en parejas, menos Pipo).

A todos: Gracias por los buenos momentos.



INDICE

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas | 1 |
| I. Resumen | 2 |
| II. Antecedentes | 3 |
| II. 1. El amaranto | 3 |
| II. 1. 1. Propiedades del amaranto | 3 |
| II. 2. Estrés osmótico | 4 |
| II. 3. Glicina betaína | 6 |
| II. 3. 1. Mecanismo de acción de la glicina betaína | 7 |
| II. 3. 2. Biosíntesis de la glicina betaína | 7 |
| II. 4. Betaína aldehído deshidrogenasas | 9 |
| II. 5. Betaína aldehído deshidrogenasa de amaranto | 10 |
| II. 5. 1. Secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional | 10 |
| II. 5. 2. Mecanismo cinético | 14 |
| II. 5. 3. Mecanismo químico | 16 |
| II. 5. 4. Regulación de su expresión y de su actividad | 18 |
| III. Planteamiento del problema | 20 |
| IV. Hipótesis | 21 |
| V. Objetivos | 22 |
| V. 1. Objetivo general | 22 |
| V. 2. Objetivos particulares | 22 |
| VI. Materiales y Métodos | 23 |
| VI. 1. Reactivos | 23 |
| VI. 2. Material biológico | 23 |
| VI. 3. Purificación de la enzima BADH | 23 |
| VI. 4. Determinación de la pureza de la enzima BADH | 25 |
| VI. 5. Determinación de la actividad de la BADH y estudios cinéticos | 25 |
| VI. 6. Seguimiento de la inactivación de la enzima | 26 |
| VI. 7. Análisis de los datos | 26 |
| VI. 8. Determinación de la reversibilidad de la inactivación | 27 |
| VI. 9. Determinación del efecto de la temperatura en la cinética de inactivación por incubación con betaína aldehído | 28 |
| VI. 10. Determinación del punto isoeléctrico | 28 |
| VI. 11. Determinación de la fluorescencia intrínseca y extrínseca de la BADH | 29 |
| VI. 12. Determinación del estado de asociación de la enzima parcialmente inactivada | 30 |
| VII. Resultados | 32 |
| VII. 1. Efecto de los ligandos en la actividad catalítica de la BADH de amaranto | 32 |
| VII. 1. 1. Efecto de los sustratos y el producto NADH bajo condiciones no catalíticas | 32 |
| VII. 1. 2. Efecto de los sustratos bajo condiciones catalíticas | 33 |
| VII. 2. Cinética de la inactivación de la BADH de amaranto por incubación con sus ligandos | 34 |
| VII. 2. 1. Inactivación causada por incubación con sus sustratos, productos y nucleótidos inhibidores | 34 |
| VII. 2. 2. Dependencia de la cinética de inactivación de la concentración de betaína aldehído | 37 |

| | | |
|------------|--|----|
| VII. 2. 3. | Adivitividad de los efectos máximos producidos por betaina aldehído y NADH | 45 |
| VII. 2. 4. | Reversibilidad de la inactivación | 46 |
| a) | La inactivación no es reversible por dilución del ligando en el medio de ensayo | 46 |
| b) | La inactivación es reversible cuando se elimina totalmente el ligando del medio de incubación por filtración en gel o por diálisis | 50 |
| VII. 2. 5. | Efecto de la temperatura en la cinética de inactivación por incubación con betaina aldehído | 52 |
| VII. 3. | Estudio de los mecanismos implicados en la inactivación de la BADH de amaranto por sus ligandos | 55 |
| VII. 3. 1. | Inactivación por oxidación de residuo(s) de cisteína | 55 |
| a) | Oxidación por especies reactivas de oxígeno | 56 |
| b) | Oxidación por oxígeno molecular | 59 |
| VII. 3. 2. | Punto isoelectrico de la BADH inactivada por betaina aldehído | 62 |
| VII. 3. 3. | Efecto de la incubación con betaina aldehído en la fluorescencia de la enzima | 63 |
| a) | Fluorescencia intrínseca | 63 |
| b) | Fluorescencia extrínseca | 65 |
| VII. 3. 4. | Estado de agregación de la enzima inactivada por betaina aldehído | 66 |
| a) | Filtración en gel | 67 |
| b) | Entrecruzamiento con glutaraldehído | 67 |
| c) | Electroforesis nativa | 69 |
| VII. 3. 5. | Estado de agregación de la enzima inactivada por glicina betaina | 69 |
| VIII. | Discusión | 71 |
| VIII. 1. | Mecanismo cinético de la inactivación | 71 |
| VIII. 2. | Bases moleculares de la inactivación por sus ligandos | 72 |
| VIII. 3. | Implicaciones fisiológicas de la inactivación de la BADH por sus ligandos | 74 |
| IX. | Resumen de resultados y conclusión general | 78 |
| X. | Referencias bibliográficas | 80 |
| XI. | Perspectivas | 85 |

TESIS CON
 FALLA DE CALIBRACION

A

ABREVIATURAS

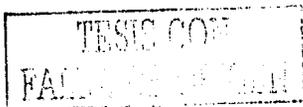
| | |
|----------|---|
| ANS | Ácido 1-anilinoftaleno 8-sulfónico |
| BA | Betaina aldehído |
| BADH | Betaina aldehído deshidrogenasa |
| DTT | Ditiotreitol |
| EDTA | Ácido etilendiamino tetraacético |
| GB | Glicina Betaína |
| HEPES | Ácido N-[2-Hidroxiethyl] piperazina-N'-[2 etanosulfónico] |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| MES | Ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico |
| MOPS | Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico |
| NEM | N-etilmaleimida |
| SDS | Dodecilsulfato de sodio |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS |

I. RESUMEN

TESIS CON
FALLA DE CALIFICACION

1-A

La betaina aldehído (BA) deshidrogenasa (BADH, BA: NAD⁺ oxidorreductasa, EC 1.2.1.8) cataliza la oxidación irreversible de la BA a glicina betaina (GB). Esta reacción se lleva a cabo en una gran variedad de organismos desde bacterias a mamíferos. La GB es un excelente osmoprotector que se acumula en el amaranto, una planta muy resistente a estrés osmótico. Poco se sabe sobre los mecanismos de regulación a mediano o corto plazo de la BADH en general y de la enzima de la planta en particular, aunque se conoce que la enzima es inducida por estrés osmótico. En el presente trabajo se caracteriza funcional y estructuralmente la posible regulación de la enzima BADH de hoja de amaranto ejercida por sus ligandos: sustratos, productos y nucleótidos inhibidores. Se encontró que la preincubación con diferentes ligandos bajo condiciones no catalíticas produce una inactivación parcial y que esta inactivación sigue una cinética de pseudoprimer orden y es dependiente de la concentración del ligando. La inactivación es reversible sólo si se elimina totalmente el ligando del medio de incubación. Los efectos máximos producidos por incubación con BA y NADH no son aditivos, lo que sugiere un mecanismo de acción común a ambos ligandos. La inactivación por BA no se debe a la oxidación de uno o más residuos de cisteína, ni por un cambio en el estado de agregación de la enzima. En cambio, la inactivación por GB se debe a la formación de tetrámeros inactivos. Es probable que los efectos de BA se deban a cambios conformacionales de la enzima inducidos por la unión de este ligando. Sin embargo, aunque se observaron cambios en los espectros de fluorescencia intrínseca y extrínseca medidos por la fluorescencia del triptofano y del ácido 1-anilinoftaleno 8-sulfónico, respectivamente, éstos no correlacionan exactamente con los observados en la actividad enzimática. Queda por explorar la posibilidad de que BA esté formando un tiohemiacetal con el residuo de cisteína esencial de la BADH, formando un complejo covalente enzima-sustrato no productivo. La inactivación de la BADH de hoja de amaranto causada por sus ligandos, particularmente por BA, NADH y GB, bajo condiciones no catalíticas puede ser de gran relevancia fisiológica si tiene lugar *in vivo*, ya que evitaría la síntesis incontrolada de GB, un compuesto que la planta no es capaz de metabolizar, y que llevaría al agotamiento del NAD⁺ intracloroplástico.



II. ANTECEDENTES

TESIS CON
FECHA DE ORIGIN

2-A

II. 1. EL AMARANTO

En las épocas precolombinas el grano de amaranto era uno de los alimentos básicos, casi tan importante como el maíz y el frijol. Miles de hectáreas de tierras aztecas, incas y de otras culturas se encontraban cultivadas con estas hermosas plantas altas y rojizas. El amaranto se entrelazaba con los rituales. Apparently, el uso del amaranto en los rituales espantó a los conquistadores españoles quienes prohibieron su cultivo, así con el colapso de las culturas indias después de la conquista, el amaranto cayó en el olvido. En América sobrevivió sólo en pequeñas áreas de cultivo esparcidas en zonas montañosas de México y los Andes. El maíz y el frijol (nativos de nuestro continente) se convirtieron en dos de los cultivos principales que alimentan al mundo, mientras que el amaranto pasó a la oscuridad (De la Cruz, 1991).

Sin embargo, con un contenido de proteína cercano al 16%, la semilla de amaranto se compara muy favorablemente con las de las variedades convencionales de trigo (12-14%), arroz (7-10%), maíz (9-10%) y otros cereales de consumo común y, además, es muy alto su contenido en lisina, un aminoácido esencial (Tenorio, 1995). El amaranto es, por lo tanto, un complemento nutricional óptimo para los cereales convencionales. Este hecho convierte a las proteínas de amaranto en objetos muy atractivos desde el punto de vista nutricional y una fuente potencial para la alimentación humana (De la Cruz, 1991).

II. 1. 1. Propiedades del amaranto

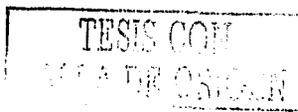
El amaranto crece vigorosamente, resiste sequías, calor, plagas y se adapta fácilmente a nuevos suelos y climas. Una de las características que más llama la atención es la rápida toma de agua para restablecer la turgencia de sus hojas (20 minutos aproximadamente) después de que la planta estuvo sometida a sequía (Flores-Zenil, 1994).

El amaranto es una planta eficiente en su proceso fotosintético, ya que es una planta con fotosíntesis C4, mecanismo de fijación de carbono que supera en eficiencia al de las plantas CAM y C3. Las plantas con fotosíntesis C4 crecen, en general, más rápidamente y responden mejor a condiciones ambientales adversas como sequía o altas temperaturas. Esto se debe a que hacen un uso más eficiente del agua consumida para formar biomasa, en comparación con las plantas C3. Las plantas C4 llevan a cabo una modificación del proceso normal fotosintético que hace eficiente el uso del CO₂ disponible en el aire, concentrándolo en los cloroplastos de células especializadas, de manera que se suprime la pérdida por fotorrespiración del CO₂ asimilado. Por lo tanto, las plantas C4 presentan una relación de conversión carbono atmosférico a carbohidratos por unidad de pérdida de agua más eficiente que las plantas C3. Cuando la planta se ve sometida a estrés osmótico, los estomas se cierran, ya que al disminuir su apertura se reduce la pérdida de agua por transpiración. Las plantas C4 aun cuando mantengan sus estomas parcialmente cerrados, son capaces de mantener velocidades de fijación de CO₂ relativamente altas.

La alta capacidad del amaranto para tolerar la pérdida de agua causada por sequía o por altas concentraciones de sales en el suelo, se debe además a que esta planta realiza un ajuste osmótico intercelular principalmente por la síntesis de solutos compatibles, particularmente glicina betaína (Gamboa *et al.*, 1991; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Esto le permite recuperar la turgencia de sus hojas rápidamente una vez que cesa el estrés osmótico.

II. 2. ESTRÉS OSMÓTICO

En México, como en muchas regiones del mundo, la sequía constituye uno de los problemas más serios para la agricultura. Más del 50% del territorio nacional es de clima



semiárido. El Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI) reporta en las cartas de uso del suelo y vegetación una amplia distribución de la agricultura de temporal: 69.76% del territorio agrícola del país es destinado a la agricultura de temporal y sólo 30.24% a la agricultura de riego (INEGI, 1998). No sólo la sequía constituye un problema para la agricultura, existen otros como el uso desmedido de fertilizantes, los cuales a la larga producen que la composición de los suelos se altere, incrementando la salinidad de éstos. La sequía y la elevada salinidad en suelos provocan en las plantas un estrés osmótico, que lleva a la pérdida de agua por las células vegetales y a la muerte de la planta si no es contrarrestado (Hare *et al.*, 1998).

Las diferentes respuestas de las plantas frente al estrés osmótico incluyen la reducción de la fotosíntesis como un efecto primario de un periodo de sequía. La disminución de la capacidad de las plantas para absorber CO₂ es atribuida al incremento en la resistencia foliar para el ingreso del carbono debido al cierre de los estomas. En experimentos en campo se observó que la disminución de la fotosíntesis y el incremento de la resistencia estomática eran debidos a la disminución del potencial de agua de las hojas (Boyer, 1982).

Una de las respuestas más importantes de las células de las plantas para protegerse del estrés osmótico es la acumulación de una gran variedad de solutos, conocidos como solutos compatibles u osmoprotectores. Estos compuestos tienen la función de mantener la turgencia de las células que se encuentran bajo estrés osmótico, ya que se acumulan en la célula incrementando así la concentración intracelular de solutos y en consecuencia el contenido de agua, sin interferir con los procesos metabólicos (Bohner *et al.*, 1995). Los solutos compatibles son definidos como pequeñas moléculas orgánicas neutras que son muy solubles en agua y que tienden a estabilizar la estructura de las proteínas (Yancey *et al.*, 1982). Compuestos representativos de los solutos compatibles incluyen ciertos polioles como el glicerol, azúcares como la sacarosa,

aminoácidos como la prolina, sales cuaternarias de amonio como la glicina betaína y compuestos relacionados. La gran sensibilidad de las plantas a situaciones de déficit hídrico moderado se debe a su poca capacidad de recuperación, luego de finalizado el periodo de estrés (Bohnert y Jensen, 1996). Las plantas resistentes son aquellas capaces de recuperarse rápidamente debido a que por lo general acumulan altas concentraciones de osmoprotectores durante el periodo de sequía. El amaranto, como ya se mencionó, es una de estas plantas resistentes.

Actualmente la manipulación de los genes implicados en la producción, la acumulación y el metabolismo de los osmoprotectores está recibiendo la atención de varios grupos de investigación (Hare *et al.*, 1998). Se ha trabajado intensamente para tratar de transferir los mecanismos de resistencia al estrés presentes en las especies silvestres de plantas a las especies cultivadas que son susceptibles al estrés osmótico, tanto por técnicas tradicionales como por ingeniería genética. Sin embargo, se requiere mayor conocimiento de las bases fisiológicas, bioquímicas y genéticas de las respuestas de las plantas al ambiente para progresar significativamente en este área.

II. 3. GLICINA BETAÍNA

La glicina betaína (N,N,N-trimetil glicina) es un compuesto anfotérico, eléctricamente neutro a pH fisiológico, que es extremadamente soluble en agua a pesar de poseer tres grupos metilo (Fig. 1).

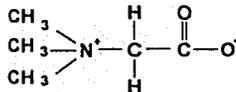


Figura 1. Estructura de la glicina betaína.

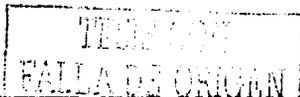
Las características moleculares de la glicina betaína permiten su interacción con dominios hidrofílicos e hidrofóbicos de macromoléculas, tales como proteínas y complejos proteínicos. Estudios *in vitro* han revelado que la glicina betaína estabiliza las estructuras de los complejos proteicos y las actividades enzimáticas; asimismo, mantiene la integridad de las membranas contra los daños producidos por exceso de sales, frío, calor y congelamiento (Nuccio *et al.*, 1998; Kishitani, *et al.*, 1994).

II. 3. 1. Mecanismo de acción de la glicina betaína

Aunque no se sabe con certeza su mecanismo de acción, existen dos hipótesis completamente opuestas para explicar cómo actúa la glicina betaína. La primera de ellas propone que la glicina betaína es excluida de la superficie de las proteínas, permitiendo que la cubierta de hidratación de éstas se mantenga. Esta "hidratación preferencial" estabiliza la estructura nativa de la proteína (Arakawa y Timasheff, 1983). La otra hipótesis formula que la glicina betaína estabiliza a las proteínas mediante una interacción directa con ellas: la porción hidrofóbica de la glicina betaína se uniría a las regiones hidrofóbicas expuestas de la proteína y como resultado permitiría que estos residuos hidrofóbicos de la proteína se mantengan en solución, evitando que la deshidratación produzca desnaturalización por agregación (Schobert, 1977). En la actualidad, la primera de estas hipótesis es la más aceptada.

II. 3. 2. Biosíntesis de la glicina betaína

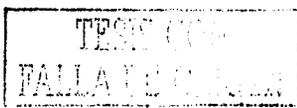
La glicina betaína se sintetiza por dos vías a partir de dos sustratos diferentes: colina y glicina (Fig. 2) (Sakamoto y Murata, 2002). La conversión de colina a glicina



II. Antecedentes

betaina (Fig. 2a) ocurre naturalmente en varias plantas, animales y microorganismos, y comprende uno o dos pasos enzimáticos, dependiendo del organismo y del modo de oxidación de la colina. En esta vía, la glicina betaina se forma como resultado de dos pasos de oxidación de colina con un intermediario tóxico, la betaina aldehído. En plantas superiores, la reacción (1) de la Figura 2 es catalizada por la colina monooxigenasa (CMO) y la reacción (2) por la betaina aldehído deshidrogenasa (BADH). Ambas enzimas están localizadas en el estroma de los cloroplastos (Rhodes y Hanson, 1993). En mamíferos y en algunas bacterias como *E. coli*, la conversión de la colina a glicina betaina es catalizada por la colina deshidrogenasa (CDH) en lugar de CMO (Lamark *et al*, 1991). La biosíntesis de la glicina betaina se induce por estrés, de manera que las plantas alcanzan concentraciones de este osmolito que van de 40 a 400 μmol por gramo de peso seco (Rhodes y Hanson, 1993).

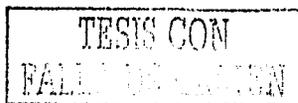
La vía de la glicina a glicina betaina (Fig. 2b) ha sido descubierta recientemente y, a la fecha, se ha encontrado en sólo dos microorganismos halófilos extremos: *Ectothiorhodospira halochloris* y *Actinopolyspora halophilica* (Nyysölä *et al.*, 2000). En estos microorganismos la glicina betaina es generada como resultado de tres sucesivas N-metilaciones de la glicina. Las enzimas glicina sarcosina metiltransferasa (GSMT) y sarcosina dimetilglicina metiltransferasa (SDMT) tienen funciones superpuestas, catalizando las primeras dos [indicadas como (1) y (2)] y las dos últimas [indicadas por (2) y (3)] metilaciones, respectivamente (Sakamoto y Murata, 2002).



II. Antecedentes

Se han reportado tres diferentes mecanismos cinéticos para las BADHs de los diferentes organismos: Ping Pong para las enzimas de *E. coli* (Falkenberg *et al.*, 1990) y del hongo *Cylindrocarpon didymum* (Mori *et al.*, 1980); Bi Bi al azar en estado estacionario para la BADH de *Pseudomonas aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 2000), e Iso Bi Bi ordenado en estado estacionario para la enzima de hojas de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) y de riñón de cerdo (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto 1998).

La BADH se encuentra ampliamente distribuida en los organismos, en los que juega diversos papeles y funciones, además del ya mencionado en la síntesis del osmoprotector glicina betaína. Así, cuando bacterias como *Sinorhizobium meliloti* (Pocard *et al.*, 1997), *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992) y *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976) se cultivan en colina o sus precursores como única fuente de carbono, nitrógeno y energía, la BADH participa en el catabolismo de la colina y posee un papel anfibólico, generando NADH y NADPH (Velasco-García *et al.*, 2000). En mamíferos la glicina betaína producida por la BADH sirve como precursor para la obtención de la metionina (Du Vigneaud *et al.*, 1946) además de ser un osmoprotector (Petronini *et al.*, 1992; Biggers *et al.*, 1993). Asimismo, la BADH está involucrada en el metabolismo de las poliaminas (Ambroziak y Pietruszko, 1991). En las plantas superiores, la BADH participa en la síntesis de la glicina betaína cuando las plantas se encuentran sometidas a estrés osmótico, como ya se ha mencionado (Rhodes y Hanson, 1993). De igual forma, se ha visto que en ciertas plantas y concretamente en el amaranto, la BADH participa en la síntesis de otros osmoprotectores, como el dimetilsulfoniopropionato (Vojtechová *et al.*, 1997a; Hanson *et al.*, 1994). Hasta la fecha, se desconocen otras funciones de la BADH de amaranto, aparte de su papel en la respuesta a estrés osmótico.



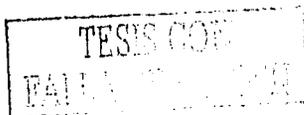
II. 5. BETAINA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE AMARANTO

A continuación se describen las características estructurales y funcionales de la BADH de hoja de amaranto.

II. 5. 1. Secuencia de aminoácidos y estructura tridimensional

En amaranto se han identificado dos genes que codifican para esta enzima: *ahybadh4* y *ahybadh17* (Legaria *et al.*, 1998). El primero de ellos se obtuvo a partir de un banco genómico y el segundo por un RT-PCR del RNA total de hojas sometidas a estrés osmótico. El gen *ahybadh4* consta de 9 kilobases con 15 exones y un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 501 aminoácidos de una masa molecular predicha de 54,503 Da. El gen *ahybadh17* codifica para una isoforma de la BADH de 500 aminoácidos, la cual contiene sólo 10 aminoácidos diferentes a la proteína que codifica el gen *ahybadh4*. Ambas proteínas muestran un 98% de identidad (Fig. 4).

| | | |
|-----------|-----|---|
| AHYBADH4 | 1 | MAIRVPSRQLFDGEWREPIKKNRIPIINPSTEEIIGDI PAATAEDVELAVAAARRALKR |
| AHYBADH17 | 1 | MAIRVPSRQLFDGEWREPIKKNRIPIINPSTEEIIGDI PAATAEDVELAVAAARRALKR |
| | | |
| AHYBADH4 | 61 | NKGEDWASASGAHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMCGKPLDEAARDIDDVAGCFEY |
| AHYBADH17 | 61 | NKGEDWASASGAHRAKYLRAIAAKITEKKDYFAKLEAMCGKPLDEAARDIDDVAGCFEY |
| | | |
| AHYBADH4 | 121 | YADQAEALDAKQKAPIALPMDTFKCHVLRKQPIGVVGLISFWNYPLLMATKQVAPALAAGC |
| AHYBADH17 | 121 | YADQAEALDAKQKAPIALPMDTFKCHVLRKQPIGVVGLISFWNYPLLMATKQVAPALAAGC |
| | | |
| AHYBADH4 | 181 | SAVLKPELASVTCLELAEVCREVGLPPGVLIHITGLGPEAGGLACHPDVDKVAFTGST |
| AHYBADH17 | 181 | SAVLKPELASVTCLELAEVCREVGLPPGVLIHITGLGPEAGGLACHPDVDKVAFTGST |
| | | |
| AHYBADH4 | 241 | ATGSKVMSSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLKAAEWTAFGCFWTHGQICSATSRL |
| AHYBADH17 | 241 | ATGSKVMSSAAQLVKPVTLELGGKSPIVIFEDVDLKAAEWTAFGCFWTHGQICSATSRL |
| | | |
| AHYBADH4 | 301 | LVHESIAAEFLDRLVKCKNIIKISDPFEEGCRIGPVVRSRQYKVKLFI STAKSEGATIL |
| AHYBADH17 | 301 | LVHESIAAEFLDRLVKCKNIIKISDPFEEGCRIGPVVRSRQYKVKLFI STAKSEGATIL |
| | | |
| AHYBADH4 | 361 | CGGSRPEHLKGGYYVEPTIISDVSTSMQIWRREEVGPVLCQKTPGSEDEAIELANDTQYG |
| AHYBADH17 | 361 | CGGSRPEHLKGGYYVEPTIISDVSTSMQIWRREEVGPVLCQKTPGSEDEAIELANDTQYG |
| | | |



II. Antecedentes

| | | |
|-----------|-----|--|
| AHYBADH4 | 421 | LGAAVLSKLLDRCEPITKALEVGVVWVHCSQPCFTQAPWGGTKRSGFGRELGEWGIENYL |
| AHYBADH17 | 421 | LGAAVLSKLLDRCEPITKALQAGIVWVWVHCSQPCFCQAPWGGTKRSGFGRELGEWGIENYL |
| ***** | | |
| AHYBADH4 | 481 | NIKQVTRDTSTDEFWGWYKSP |
| AHYBADH17 | 481 | NIKQVTEYISDEFWGWYKSP |
| ***** | | |

Figura 4. Secuencia de aminoácidos de la BADH de amaranto codificada por los genes *ahybadh4* y *ahybadh17* (Legaria *et al.*, 1998). La cisteína esencial (294) se muestra con negritas. Los asteriscos señalan los aminoácidos idénticos en ambas proteínas.

El alineamiento de la secuencia de esta enzima con otras BADHs muestra una alta similitud, particularmente con aquellas que pertenecen a la familia de las Chenopodiaceae (78% con *Atriplex prostrata*, *A. centralasiatica*, *Beta vulgaris*, *Suaeda liaotungensis* y *Spinacia oleracea*), mientras que la menor identidad se da con la de bacteria *Streptomyces coelicolor* (42%).

La forma nativa de la enzima es un homodímero con dos sitios activos (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Recientemente, en nuestro laboratorio, se construyó un modelo tridimensional con base en la secuencia de aminoácidos que se dedujo a partir del gen *ahybadh17* (González-Segura y Muñoz-Clares, datos sin publicar) y las coordenadas cristalográficas de la única BADH cristalizada hasta la fecha, la de hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998). Al igual que la estructura tridimensional de otras aldehído deshidrogenasas, cada monómero de la BADH de amaranto tiene tres dominios distintos: un dominio de unión al nucleótido (NAD⁺) que tiene una estructura α/β con un plegamiento de tipo Rossmann, un dominio catalítico o de unión al sustrato aldehído, el cual tiene un plegamiento similar al de la parte central del dominio de unión a la coenzima, y un dominio de asociación (necesario para la dimerización) (Fig. 5).

TESIS CON
FALLA DE CALIBRE

II. Antecedentes

dominio
catalítico

dominio de unión a
la coenzima

dominio de
oligomerización

Figura 5. Modelo tridimensional de la BADH de amaranto.

Cada monómero cuenta con 16 residuos de cisteína, siendo el residuo Cys294 el catalítico, conservado en todas las ALDHs. Como en otras ALDHs, en la BADH el residuo de cisteína esencial para la catálisis se encuentra localizado en el fondo de un túnel que va desde la superficie de la molécula hacia este residuo (Steinmetz *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1998; Ahvazi *et al.*, 2000). Cabe destacar que en el modelo tridimensional de la BADH se observa un residuo de cisteína (Cys 453) próximo a la cisteína esencial, a tan sólo 7 Å de distancia, y ambos residuos son accesibles al medio. Este residuo de cisteína no esencial está conservado en todas las BADHs de plantas. Además, los residuos Glu260 y Asn162 (numeración de *A. hypochondriacus*) están conservados en todas las ALDHs y se sabe que participan en la reacción catalizada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. 5. 2. Mecanismo cinético

Estudios cinéticos detallados de la BADH de hojas de amaranto han permitido establecer el mecanismo cinético de la enzima (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Vojtechová *et al.*, 1997a, 1997b; Muñoz-Clares y Mújica-Jiménez, 2001). La BADH de amaranto sigue una cinética michaeliana, tanto para el sustrato como para la coenzima, y exhibe un mecanismo cinético ordenado con la unión del NAD^+ en primer lugar, siendo el NADH el último producto en disociarse. El NAD^+ y el NADH se unen a diferentes formas de la enzima libre, lo que es propio de un mecanismo Iso (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) (Fig. 6).

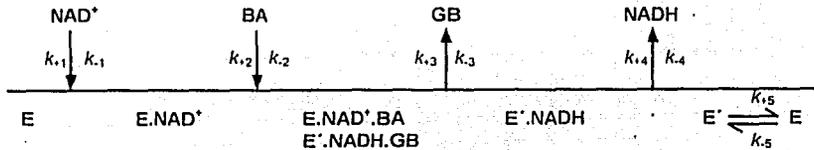


Figura 6. Mecanismo cinético de la BADH de amaranto: Iso Bi Bi ordenado en estado estacionario. BA, betaína aldehído; GB, glicina betaína. Tomado de Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993.

El paso de la isomerización de la enzima libre se ha propuesto con base en tres observaciones: (1) la inhibición mixta del NADH frente al NAD^+ ; (2) la adición ordenada de los sustratos a la enzima, como se dedujo en los estudios de velocidad inicial e inhibición sin salida, siendo el NAD^+ el primer sustrato en combinarse con la enzima y el NADH el último producto en disociarse y (3) la irreversibilidad de la reacción. La isomerización de la enzima libre debe ser, al menos parcialmente, limitante de la velocidad de la reacción, lo que es consistente con el hallazgo de que el paso limitante de la reacción ocurre después de la transferencia del hidruro (Muñoz-Clares y Mújica-Jiménez, 2001). Éste uno de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. Antecedentes

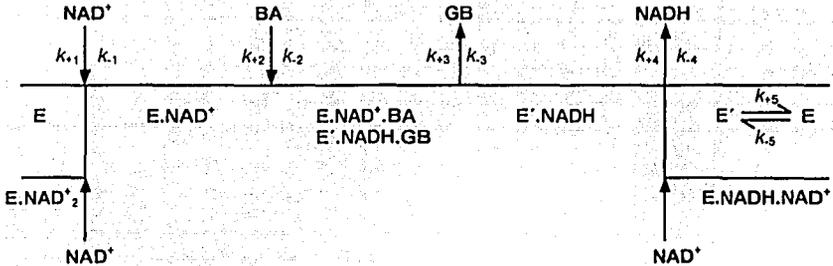


Figura 8. Complejos abortivos de los nucleótidos con la BADH de hoja de amaranto. Tomado de Muñoz-Clares y Mújica-Jiménez (2001).

La formación de estos complejos sugiere que el nucleótido es capaz de unirse en el sitio de la betaína aldehído, debido a que existe cierta similitud estructural entre el dominio catalítico y el de unión a la coenzima. Ésta es una característica común de varias deshidrogenasas (Kutzenko *et al.*, 1998 y Johansson *et al.*, 1998). Sin embargo, para que ocurra esta unión se requieren altas concentraciones de los nucleótidos.

II. 5. 3. Mecanismo químico

Para la BADH de hoja de amaranto se ha propuesto un mecanismo químico similar al de las ALDHs. En estas enzimas, una vez que se ha formado el complejo ternario productivo E-NAD⁺-aldehído, el tiol de la cisteína esencial realiza un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del sustrato aldehído, formando como intermediario covalente un tiohemiacetal (paso 1 en la Fig. 9), con la ayuda de un ácido (Glu260) que cedería un protón (Farrés *et al.*, 1995; Weiner *et al.*, 1995). Otros autores (Ahvazi *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2001) proponen que no hay transferencia del protón y que se forma el oxianión del tiohemiacetal. En cualquier caso, la formación del intermediario tetraédrico

implica un cambio conformacional del sustrato en el cual un carbono trigonal plano cambia a tetraédrico, lo que causa un movimiento en el átomo de oxígeno que pasa a formar un puente de hidrógeno con el residuo conservado de asparagina (Asn162). Este puente de hidrógeno estabiliza al oxanión, lo que facilita la transferencia del ion hidruro hacia la posición C4 de la coenzima (paso 2), con la consiguiente oxidación del tiohemiacetal en el correspondiente tioéster. Una vez que se ha formado el tioéster, un residuo aminoácido básico (Glu260) desprotona a una molécula de agua, que ataca al tioéster formándose el producto ácido de la reacción, la glicina betaina (paso 3) (Cobessi *et al.*, 2000; Ahvazi *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2001). Posteriormente se produce la liberación ordenada de los productos (pasos 4 y 5) y, en el caso de la BADH de hoja de amaranto, tiene lugar la isomerización de la forma libre de la enzima que no se muestra en el esquema propuesto por Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares (1993) que consiste en la desprotonación del tiol catalítico, acompañada de un cambio conformacional (Fig. 9).

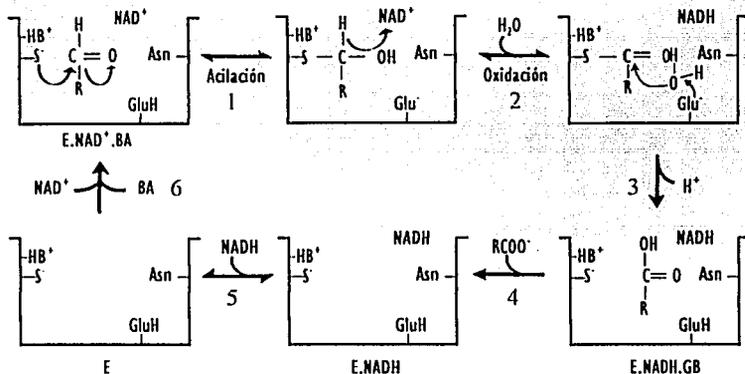


Figura 9. Esquema simplificado del mecanismo de reacción propuesto para la BADH de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) basado en el de las ALDHs (Farrés *et al.*, 1995, Marchal *et al.*, 2001).

II. 5. 4. Regulación de su expresión y de su actividad

Estudios previos en el laboratorio (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) mostraron que la actividad máxima de la BADH en extractos crudos de hojas de amaranto no estresadas es casi despreciable; sin embargo, cuando las hojas se sometieron a déficit de agua por incubación con polietilenglicol esta actividad se incrementa notablemente a medida que transcurre el tiempo de exposición. En forma paralela, se produce un aumento en los niveles de glicina betaina. Después de 4 horas de tratamiento se observó que la actividad de la enzima y el contenido de glicina betaina disminuyen, sugiriendo que la respuesta de la planta a un déficit severo y prolongado de agua es mediado por un mecanismo diferente y que, al menos en hojas de amaranto, la síntesis de glicina betaina es una respuesta temprana frente al déficit de agua.

Los cambios en la actividad máxima de la BADH son el resultado de una regulación de la transcripción del gen, ya que el análisis de la expresión del gen *ahybadh17* de hojas de amaranto revelan que los niveles de ARN mensajero, así como la concentración de la proteína, se incrementan rápidamente cuando las hojas son expuestas a estrés osmótico, provocado por el déficit de agua y por la exposición a una alta concentración de sales, y al fitoregulator ácido abscísico (ABA) (Legaría *et al.*, 1998).

Puesto que la reacción que cataliza esta enzima es irreversible (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y el producto de la reacción, la glicina betaina, no es metabolizada una vez sintetizada (Rhodes y Hanson, 1993) es de esperarse que, además de esta regulación a largo plazo de la actividad de la BADH, existan mecanismos que permitan una regulación a corto o mediano plazo.

Como se ha mencionado, la enzima presenta una cinética michaeliana a bajas concentraciones de sustrato y se desconoce si existe algún mecanismo regulador de la actividad de esta enzima, aparte del que involucra a la expresión génica. Hasta la fecha

II. Antecedentes

no se ha encontrado ningún metabolito que pudiera, por regulación alostérica, controlar su actividad. No obstante, la BADH de amaranto es inhibida por altas concentraciones de sus sustratos betaina aldehído y el dinucleótido oxidado. El NADH, producto de la reacción, también produce inhibición (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993), mientras que el otro producto, la glicina betaina, no inhibe significativamente. La inhibición por NADH no parece tener relevancia fisiológica, dado que su afinidad por la enzima es mucho menor que la del NAD⁺ (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares 1993) y que la concentración de este compuesto en el cloroplasto es también mucho menor a la del NAD⁺ (Hauser *et al.*, 1995). Tampoco parece ser relevante fisiológicamente la inhibición por NAD⁺, que requiere concentraciones mucho mayores a las fisiológicas, pero se desconoce si la inhibición por betaina aldehído puede suponer un mecanismo de control, ya que no se sabe a la fecha cuáles son los niveles de este aldehído en el cloroplasto de hojas estresadas y como estos niveles cambian a medida que el estrés progresa.

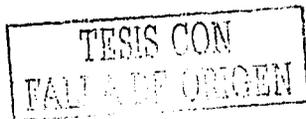
Por otra parte, estudios de modificación química de la BADH de amaranto han demostrado que los ligandos de la enzima promueven la inactivación, lo que estaría indicando cambios conformacionales inducidos en la enzima por los ligandos (Velasco-García *et al.*, 2003). Estos cambios conformacionales, si se reflejan en la actividad de la enzima, podrían constituir un mecanismo de regulación.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. Planteamiento del problema

En nuestro laboratorio estamos interesados en determinar los factores que regulan la actividad de la enzima BADH de hoja de amaranto a corto o mediano plazo y estudiar sus mecanismos de acción. Estudios de modificación química sugirieron que la enzima presenta cambios conformacionales, inducidos por sus ligandos, que afectan la reactividad de la cisteína catalítica (Velasco-García *et al.*, 2003). En este trabajo se propone investigar si los cambios conformacionales producidos por los ligandos se traducen en cambios en la actividad de la enzima y, por tanto, si pueden ser la base de un mecanismo de regulación de su actividad.



IV. HIPÓTESIS

Los sustratos y los productos de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de *Amaranthus hypochondriacus* regulan su actividad por un mecanismo adicional al de su participación en la reacción catalizada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. OBJETIVOS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

21-A

V. 1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar funcional y estructuralmente el efecto que, bajo condiciones no catalíticas, tienen los sustratos y productos de la enzima BADH de hoja de amaranto sobre su actividad.

V. 2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Determinar cuáles de los ligandos de la BADH, sustratos, productos o inhibidores, modifican la actividad catalítica cuando la enzima se incuba en su presencia.
- ❖ En caso de encontrar este efecto, caracterizarlo cinéticamente, estudiando:
 - a) la cinética del cambio de actividad,
 - b) la dependencia de esta cinética de la concentración del ligando y
 - c) la dependencia de la temperatura de la velocidad del cambio.
- ❖ Investigar si los efectos máximos de los diferentes ligandos son o no aditivos.
- ❖ Estudiar la reversibilidad del efecto inducido por los ligandos.
- ❖ Investigar el mecanismo responsable de este efecto, estudiando si se afecta:
 - a) el estado de agregación de la enzima,
 - b) su estructura terciaria y
 - c) el estado de oxidación de alguno de sus residuos de cisteína.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

TESTS CON
SALA DE CINCHEN

RR. A

VI. 1. REACTIVOS

Todos los productos usados en este trabajo fueron de calidad analítica: NAD⁺, NADH, betaina aldehído, glicina betaina, AMP, ADP, ATP, HEPES, MES, EDTA, glicerol, β-mercaptoetanol, glicina y glutaraldehído fueron suministrados por Sigma (Toluca, México).

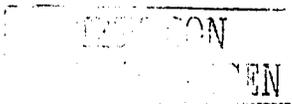
VI. 2. MATERIAL BIOLÓGICO

Se cultivaron plantas de *A. hypochondriacus* L. en invernadero a una temperatura de 18-30° C. Las plantas se cosecharon a una edad de 2 meses para extraer y purificar la proteína. Las hojas intactas de las plantas fueron sometidas previamente a déficit hídrico. Para esto, las hojas de amaranto se colocaron bajo la exposición directa de los rayos del sol por un periodo de 3 horas.

VI. 3. PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA BADH

La BADH se purificó usando una modificación al protocolo original (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Para ello, 250 g de hojas de amaranto estresadas hídricamente se maceraron en una licuadora comercial con 400 mL del amortiguador A [HEPES-KOH 50 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, glicerol 10 % (v/v) y β-mercaptoetanol 10 mM (el reductor se adiciona al momento)]. El macerado se filtró a través de una malla de 6 capas de gasa para eliminar los restos de tejido vegetal; el filtrado se centrifugó a 7,800 x g durante 30 min a 4° C con la propósito de separar totalmente los restos de tejido de las hojas. Se recuperó el sobrenadante, el cual se precipitó con sulfato de amonio al 30 % (w/v). Se centrifugó a 25,350 x g durante 30 min a 4° C. El sobrenadante se precipitó nuevamente con sulfato de amonio, al 70 % (w/v) y se centrifugó bajo las condiciones

anteriores. El precipitado se resuspendió en el amortiguador A y se sometió a una centrifugación a 105,000 x g durante 30 min a 4° C. El sobrenadante se desaló mediante filtración en gel en una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia), equilibrada y eluida con amortiguador A. El eluido se aplicó a una columna de intercambio iónico Sefarosa Q de flujo rápido (1.8 x 3.65 cm) (Pharmacia) equilibrada con el mismo amortiguador. Después de lavar la columna, la enzima se eluyó con un gradiente de cloruro de potasio (0-500 mM) en el amortiguador A, con un flujo de 0.5 mL/min. Se recolectaron las fracciones y aquellas que presentaban actividad se pasaron por una columna de Sephadex G-25 equilibrada y eluida con un amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM, pH 6.5, EDTA 0.1 mM, glicerol 10% (v/v), β -mercaptoetanol 10 mM (amortiguador B). El desalado se cromatografió en una columna de afinidad 5'-AMP sefarosa (Pharmacia) (1 mL de volumen de cama) previamente equilibrada con el amortiguador B. La columna se lavó con amortiguador B y se eluyó con un gradiente de AMP (0-0.2 mM) con un flujo de 0.5 mL/min. Finalmente, las fracciones que presentaron actividad enzimática se aplicaron a una columna de intercambio iónico (Mono-Q HR) (Pharmacia) acoplada a un sistema de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) (Waters) con el objetivo de obtener más enzima totalmente pura. La columna se equilibró en HEPES-KOH 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v) y β -mercaptoetanol 10 mM y la enzima fue eluida con un gradiente de cloruro de potasio (0-500 mM) en este mismo amortiguador. La BADH eluye a una concentración de 180 mM de KCl y de esta forma se almacena en alícuotas a -70° C. El amortiguador de almacenamiento es por tanto: HEPES-KOH 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), KCl 180 mM y β -mercaptoetanol 10 mM (amortiguador C). Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente, excepto los pasos de extracción y cromatografía de intercambio iónico en Sefarosa Q, los cuales se realizaron a 4° C. La cuantificación proteica se realizó mediante un ensayo basado en el método de Bradford (1976), usando albúmina sérica de bovino como patrón.



VI. 4. DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA ENZIMA BADH

La pureza de la enzima se corroboró mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) por el método de Laemmli (1970). Éste es un sistema discontinuo de acrilamida/bisacrilamida para la resolución de proteínas desnaturalizadas con SDS, en el que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de un agente reductor (β -mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro) y desnaturalizante (SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína) y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. El gel separador se preparó al 10%. Las muestras fueron calentadas a 95° C durante cinco minutos antes de cargarse al gel, con la finalidad de desplegar completamente la proteína. Se usaron proteínas con masas moleculares conocidas, en un intervalo de 66 a 669 kDa (Amersham), para determinar el peso molecular aparente de la BADH, ya que las moviidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones aproximadamente lineales del logaritmo de su peso molecular. La corrida electroforética se llevó a cabo con una diferencia de potencial de 115 V durante 2 horas, en un equipo Mighty Small II (Hoefer). Las proteínas se visualizaron mediante la tinción del gel con nitrato de plata (Wray *et al.*, 1981). La evaluación de las bandas obtenidas (cálculo de las masas moleculares) se realizó por análisis de imagen en el sistema Fluoroscan (Bio Rad).

VI. 5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA BADH Y ESTUDIOS CINÉTICOS

Los estudios de caracterización cinética de la enzima se llevaron a cabo por métodos clásicos de determinación de la velocidad inicial en estado estacionario, usando el ensayo espectrofotométrico de actividad (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), como se describe a continuación. En una cubeta de espectrofotómetro de 1 cm de paso de luz se adicionaron los sustratos de la enzima, betaína aldehído 0.4 mM y NAD⁺ 1 mM en 0.5 mL de un amortiguador HEPES-KOH 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0. La aparición

de los productos glicina betaina y NADH se da al momento de adicionar la preparación enzimática (10 μ L) a la cubeta con una concentración de proteína de 0.25 mg/mL. La actividad enzimática se calculó a 30° C a partir del aumento en la absorbancia a 340 nm, debido a la aparición del NADH durante los primeros 90 segundos de la reacción. Se usó un espectrofotómetro Lambda Bio 10 de Perkin Elmer con control de temperatura.

Los datos cinéticos se analizaron por regresión no lineal, usando el programa de cómputo comercial MicroCal Origin (Microcal Software, Inc. Northhampton, Ma, USA).

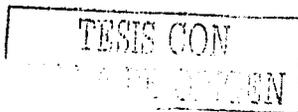
VI. 6. SEGUIMIENTO DE LA INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA

La enzima pura se incubó en presencia de diferentes ligandos, sustratos, productos o inhibidores en el mismo amortiguador en el que se almacena (HEPES-KOH 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, glicerol 10% (v/v), KCl 180 mM, β -mercaptoetanol 10 mM) y se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual y seguir el curso temporal de los cambios en actividad. Como control, se incubó a la enzima en ausencia del ligando, por el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones que las incubaciones en presencia de ligandos. La cinética del proceso de inactivación se estudió analizando los datos experimentales por regresión no lineal.

VI. 7. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Para el análisis de las cinéticas de inactivación parcial de primer orden, se usó la siguiente ecuación:

$$\frac{A_t}{A_0} \times 100 = e^{-kt} + \frac{A_\infty}{A_0} \quad \text{ecuación (1)}$$



en donde A_t , A_0 y A_∞ representan la actividad de la enzima al tiempo t , al tiempo cero y al tiempo infinito, respectivamente, y k es la constante de velocidad de primer orden del proceso de inactivación.

Los valores de la constante de velocidad, k_{obs} , y de la inactivación al equilibrio, $Inact_\infty$, estimados a las diferentes concentraciones de ligandos se emplearon para obtener la constante de disociación, real o aparente respectivamente, del complejo Enzima-ligando, mediante el ajuste de los datos a una hipérbola equilátera:

$$\frac{A_{max} \times [S]}{K_d + [S]} \quad \text{ecuación (2)}$$

en donde A_{max} , representa el valor máximo del parámetro usado en el ajuste (k_{obs} o $Inact_\infty$), K_d , la constante de disociación del complejo Enzima-ligando, y $[S]$, la concentración de sustrato.

VI. 8. DETERMINACIÓN DE LA REVERSIBILIDAD DE LA INACTIVACIÓN

Para determinar si la inactivación se revierte cuando se elimina el ligando del medio de incubación se siguieron tres procedimientos:

1. Tras la inactivación parcial por incubación con betaína aldehído 4 mM, una alícuota de 10 μ l de la preparación de la enzima se llevó al medio de ensayo donde se incubó por diferentes tiempos, hasta un máximo de 120 min, antes de añadir los sustratos para dar inicio a la reacción. La concentración final de betaína aldehído en este medio, antes de la adición del sustrato, fue de 0.08 mM.
2. La enzima parcialmente inactivada por incubación con sus ligandos se desaló en una columna de filtración en gel (Sephadex G-25), previamente equilibrada con el

amortiguador en el que se encuentra la enzima (amortiguador C) siguiendo el método de Penefsky (1979), tras lo cual se determinó su actividad específica.

3. En otros experimentos se llevó a cabo una diálisis de la enzima parcialmente inactiva contra 1000 volúmenes del amortiguador C durante toda la noche, a temperatura ambiente.

VI. 9. DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN POR INCUBACIÓN CON BETAÍNA ALDEHÍDO

Se siguió la inactivación de la enzima (0.125 mg/mL) por betaína aldehído 10 mM como se describió en la sección VI. 6., a diferentes temperaturas: 0, 10, 20, 30 ó 40° C. Se hizo un gráfico de Arrhenius con el logaritmo natural de las constantes de velocidad obtenidas a cada temperatura absoluta frente al inverso de la temperatura. De la pendiente de la línea se calculó la energía de activación de Arrhenius del proceso de inactivación de la enzima por betaína aldehído, considerando que

$$m = \frac{-E_a}{R} \quad \text{ecuación (3)}$$

en donde m es la pendiente, E_a es la energía de activación y R es la constante general de los gases ($1.987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

VI. 10. DETERMINACIÓN DEL PUNTO ISOELÉCTRICO

Se hizo un electroenfoque de la enzima control y de la enzima que había sido tratada con betaína aldehído, a una concentración de 0.125 mg/mL. El electroenfoque se basa en el desplazamiento de las moléculas en un gradiente de pH. Las moléculas

anfotéricas, como los aminoácidos, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial eléctrico y un gradiente de pH. La región del ánodo (+) es ácida y la del cátodo (-) es alcalina. Entre ambos se establece un gradiente de pH, de tal manera que las moléculas que se han de separar tengan su punto isoelectrónico dentro del intervalo. Los geles empleados aquí, obtenidos de la casa comercial Pharmacia, son geles homogéneos de poli(acrilamida (5% T, 3% C), con Pharmalyte® cargado de anfólitos; el Pharmalyte genera un gradiente estable y lineal de pH durante la corrida. La corrida se realizó con un microlitro de muestra (0.25 µg de proteína) en un sistema rápido PhastSystem LKB (Pharmacia) a 2000 Volts, 2.5 mA, 3.5 W, 15° C durante 30 min. La tinción de estos geles se hizo con el kit Silver Stain Plus de Bio Rad.

El punto isoelectrónico teórico de la enzima se calculó con base en la secuencia de aminoácidos de la proteína derivada del gen *ahybadh17* mediante el servidor ExPASy, Molecular Biology, para delimitar el intervalo de pH que debíamos emplear, de esta manera decidimos utilizar geles con un intervalo de pH de 4.0 a 6.5.

VI. 11. DETERMINACIÓN DE LA FLUORESCENCIA INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA DE LA BADH

Para estudiar posibles alteraciones en la estructura terciaria de la BADH inducidas por los ligandos, se determinó la fluorescencia intrínseca y extrínseca mediada por la fluorescencia del triptofano y del reportero ANS, respectivamente. Se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu 5000U. Los experimentos se hicieron a temperatura ambiente y los cambios observados en la intensidad de la fluorescencia se reportaron en unidades relativas. En ambos casos la enzima se encontraba en el amortiguador de almacenamiento (amortiguador C).

anfotéricas, como los aminoácidos, se separan en un medio en el que existe una diferencia de potencial eléctrico y un gradiente de pH. La región del ánodo (+) es ácida y la del cátodo (-) es alcalina. Entre ambos se establece un gradiente de pH, de tal manera que las moléculas que se han de separar tengan su punto isoelectrónico dentro del intervalo. Los geles empleados aquí, obtenidos de la casa comercial Pharmacia, son geles homogéneos de poliacrilamida (5% T, 3% C), con Pharmalyte® cargado de anfólitos; el Pharmalyte genera un gradiente estable y lineal de pH durante la corrida. La corrida se realizó con un microlitro de muestra (0.25 µg de proteína) en un sistema rápido PhastSystem LKB (Pharmacia) a 2000 Volts, 2.5 mA, 3.5 W, 15° C durante 30 min. La tinción de estos geles se hizo con el kit Silver Stain Plus de Bio Rad.

El punto isoelectrónico teórico de la enzima se calculó con base en la secuencia de aminoácidos de la proteína derivada del gen *ahybadh17* mediante el servidor Expasy, Molecular Biology, para delimitar el intervalo de pH que debíamos emplear, de esta manera decidimos utilizar geles con un intervalo de pH de 4.0 a 6.5.

VI. 11. DETERMINACIÓN DE LA FLUORESCENCIA INTRÍNSECA Y EXTRÍNSECA DE LA BADH

Para estudiar posibles alteraciones en la estructura terciaria de la BADH inducidas por los ligandos, se determinó la fluorescencia intrínseca y extrínseca mediada por la fluorescencia del triptofano y del reportero ANS, respectivamente. Se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu 5000U. Los experimentos se hicieron a temperatura ambiente y los cambios observados en la intensidad de la fluorescencia se reportaron en unidades relativas. En ambos casos la enzima se encontraba en el amortiguador de almacenamiento (amortiguador C).

1. **Fluorescencia intrínseca.** Se obtuvo el espectro de fluorescencia intrínseca de la enzima por excitación de sus triptofanos a una longitud de onda de 296 nm. Posteriormente, se le adicionó betaína aldehído 10 mM y se siguieron los cambios en dicho espectro a través del tiempo. Los espectros de emisión se recogieron en un intervalo de 300 a 450 nm. La concentración de enzima empleada fue de 0.125 mg/mL.

Para obtener la constante de velocidad del cambio en la fluorescencia intrínseca de la enzima provocado por la betaína aldehído, se calculó el incremento de fluorescencia (ΔF) en la λ_{max} a cada uno de los tiempos indicados y se graficó el ΔF contra la concentración del aldehído. El ΔF se calculó como la diferencia entre la intensidad de la fluorescencia al tiempo t (F_t) y al tiempo cero (F_0).

2. **Fluorescencia extrínseca.** En el caso de la fluorescencia extrínseca se empleó ANS como reportero de los cambios. El ANS es un fluoróforo sintético que se une de manera no covalente a las regiones hidrofóbicas de la enzima, variando sus características espectroscópicas en función del microambiente que le rodea; es decir, cambia su espectro de emisión en función de la polaridad del medio (Slavik, 1982). El ANS se excita a 360 nm y su intervalo de emisión es de 400-600 nm. Se obtuvieron los espectros de fluorescencia del complejo enzima-ANS en ausencia y en presencia del ligando betaína aldehído a una concentración 10 mM. La concentración empleada de enzima fue de 0.170 mg/mL y la del ANS 20 μ M.

VI. 12. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE ASOCIACIÓN DE LA ENZIMA PARCIALMENTE INACTIVADA

Se hicieron dos tipos de experimentos:

1. **Cromatografía de exclusión molecular.** La BADH activa y parcialmente inactiva por incubación con sus ligandos se cromatografió en una columna de exclusión

molecular Superdex 200 HR 10/30 (Pharmacia) acoplada a un sistema de HPLC (Waters). La columna se equilibró y eluyó con el amortiguador de almacenamiento (amortiguador C), en ausencia (control) y presencia del ligando (enzima parcialmente inactivada por incubación previa con betaina aldehído 10 mM ó glicina betaina 200 mM). En ambos casos se aplicaron a la columna 200 μ L de enzima a una concentración de 0.25 mg/mL. La velocidad de flujo del amortiguador de elución fue de 0.5 mL/min ó 0.4 mL/min y las muestras se corrieron a 90 psi de presión.

- 2. Entrecruzamiento con glutaraldehído.** Muestras de la enzima (1.25 μ g) activa (control) y parcialmente activa (previamente tratada con betaina aldehído 4 mM) en el amortiguador C se incubaron a temperatura ambiente con glutaraldehído 30 mM durante diferentes tiempos hasta 7 min. El glutaraldehído es un agente entrecruzante que reacciona de manera covalente con los grupos amino de los residuos de lisina de la protelna formando uniones intermoleculares o intramoleculares. La reacción con glutaraldehído se detuvo con una solución saturada de glicina 4 M, pH 9.3. tras lo cual las muestras fueron resueltas en una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 7% de acuerdo al método de Laemmli (1970).
- 3. Electroforesis nativa.** La enzima activa y la parcialmente activa (preincubada con betaina aldehído 10 mM) se sometieron a electroforesis en un gel nativo en un gradiente de 5-15% de poliacrilamida. Los geles que se utilizaron para esta electroforesis se adquirieron de la casa comercial Pharmacia. El sistema amortiguador del gel está compuesto de Tris 112 mM, pH 6.4, acetato 112 mM y el amortiguador de corrida es Tris 250 mM, pH 8.8, L-alanina 880 mM. La corrida se realizó en un sistema rápido PhastSystem LKB (Pharmacia) bajo las siguientes condiciones: 400 Volts, 1.0 mA, 2.5 W a 15° C durante una hora.

VII. RESULTADOS

VII. Resultados

Para cumplir con los objetivos planteados se llevaron a cabo los experimentos que se describen a continuación.

VII. 1. EFECTO DE LOS LIGANDOS EN LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DE LA BADH DE AMARANTO

VII. 1. 1. Efecto de los sustratos y del producto NADH bajo condiciones no catalíticas

Con la finalidad de explorar qué el efecto de los sustratos betaína aldehído y NAD⁺ y el producto NADH sobre la actividad de la BADH bajo condiciones no catalíticas, se incubó a la enzima (5 µg/mL) en el medio de ensayo (HEPES-KOH 100 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) durante 30 min con cada uno de estos ligandos. Transcurridos los 30 min, se añadieron el o los sustratos faltantes para la catálisis y se determinó la actividad enzimática (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la preincubación en el medio de ensayo con los ligandos sobre la actividad de la BADH

| Adición | Tiempo cero | | | | | | | | | |
|------------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|------------------|-----|----|----|------|----|
| | Controles | | | | NAD ⁺ | | BA | | NADH | |
| Enzima | + | + | + | | + | + | + | + | + | + |
| Betaína aldehído 10 mM | | | | + | + | | + | + | | |
| NAD ⁺ 1 mM | | | | + | | + | | | | |
| NADH 50 µM | | | | | | | | | | + |
| β-mercaptoetanol 10 mM | | | + | | | + | | + | + | + |
| | Después de 30 min de preincubación | | | | | | | | | |
| Enzima | | | | + | | | | | | |
| Betaína aldehído 10 mM | + | + | + | | | + | | | + | + |
| NAD ⁺ 1 mM | + | + | + | | + | | + | + | + | + |
| NADH 50 µM | | | | | | | | | + | |
| β-mercaptoetanol 10 mM | | + | | | | | + | | | |
| Actividad (mU/mL) | 139 | 155 | 165 | 143 | 73 | 114 | 78 | 87 | 107 | 75 |

VII. Resultados

La actividad de la enzima fue mayor cuando estuvo presente β -mercaptoetanol 10 mM durante la preincubación o durante el ensayo. Se observó que, bajo estas condiciones experimentales, la incubación con cualquiera de los ligandos produce en la BADH una inactivación, mientras que la enzima preincubada bajo las mismas condiciones pero en ausencia de ligandos no se inactiva.

El otro producto de la reacción, glicina betaina, no se usó en estos experimentos, dado que se conoce que se une muy pobremente a la enzima (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993).

VII. 1. 2. Efecto de los sustratos bajo condiciones catalíticas

Para explorar si el efecto inactivante que tenían los sustratos betaina aldehído y NAD⁺ sobre la BADH también se presentaba bajo condiciones catalíticas, se incubó a la enzima (5 μ g/mL) en el medio de ensayo con ambos ligandos a concentraciones saturantes, 10 y 1 mM, respectivamente, y seguimos su actividad durante 30 min. Se encontró que la actividad de la enzima se mantiene estable durante este periodo (Fig. 1), a diferencia de lo observado cuando la incubación se hace con sólo uno de los ligandos. Por tanto, la inactivación provocada por los ligandos no tiene lugar cuando todos los sitios activos están ocupados y realizando la catálisis.

VII. Resultados

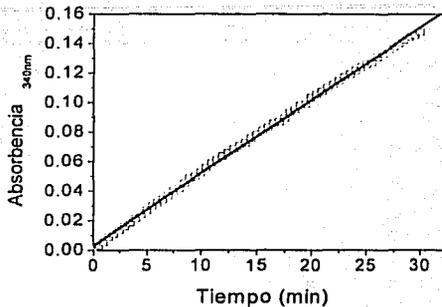


Figura 1. Curso temporal de la reacción catalizada por la BADH de hoja de amaranto. Se siguió la actividad de la enzima en presencia de betaina aldehído 10 mM y NAD⁺ 1 mM durante 30 min usando el mismo medio de ensayo que en los experimentos de la Tabla 1.

Este mismo experimento se realizó con diferentes concentraciones de enzima (10, 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$) y, en todos los casos, se obtuvo absoluta linealidad en el ensayo. Además, la actividad determinada fue proporcional a la concentración de enzima adicionada (datos no mostrados).

VII. 2. CINÉTICA DE LA INACTIVACIÓN DE LA BADH DE AMARANTO POR INCUBACIÓN CON SUS LIGANDOS

VII. 2. 1. Inactivación causada por incubación con sus sustratos, productos y nucleótidos inhibidores

Para determinar la cinética de la inactivación, la enzima se incubó con el sustrato betaina aldehído, el producto glicina betaina, las coenzimas oxidadas NAD(P)⁺ y reducidas NAD(P)H y los nucleótidos AMP, ADP y ATP (inhibidores análogos del sustrato)

VII. Resultados

y se midió la actividad residual a lo largo del tiempo en un intervalo de 0 a 180 min. Los datos de actividad residual obtenidos a los diferentes tiempos muestran una cinética de inactivación de primer orden o seudoprimer orden que alcanza una meseta a tiempos largos de incubación (Fig. 2).

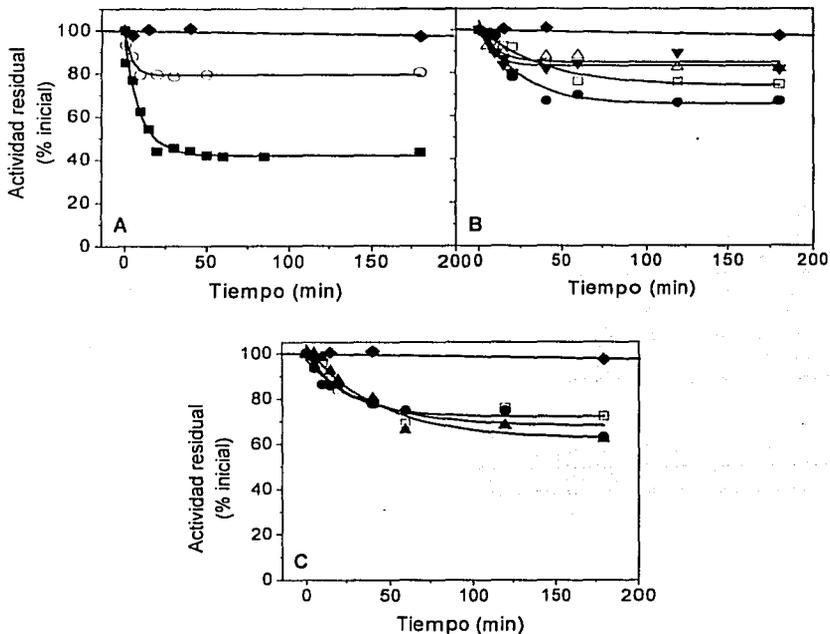


Figura 2. Cinética de inactivación de la BADH de hoja de amaranto durante la incubación con sus diferentes ligandos. A) betanina aldehído 5 mM (■) ó glicina betanina 50 mM (○). B) NAD⁺ 5 mM (□), NADH 5 mM (●), NADP 5 mM (△) ó NADPH 5 mM (▼). C) AMP 10 mM (□), ADP 10 mM (●) ó ATP 10 mM (▲). Enzima control no incubada con ligandos (◆). La concentración de enzima fue de 0.125 mg/mL.

Los valores de las constantes de velocidad y del grado de inactivación, estimados por ajuste de los datos experimentales mostrados en la Figura 2 a una exponencial

VII. Resultados

sencilla (ecuación 1 en Materiales y Métodos), se muestran en la Tabla 2. De todos los ligandos probados, la betaína aldehído es la que produjo un mayor grado de inactivación, aproximadamente un 60%. Los demás ligandos produjeron niveles de actividad parecidos, entre el 62 y el 85 % de la inicial, siendo el NAD⁺ y el par NADP⁺/NADPH los que provocan un menor descenso en la actividad de la BADH.

Por lo que respecta a la velocidad del proceso, puede observarse que a igual concentración el par NAD⁺/NADH inactiva más lentamente a la enzima que el par NADP⁺/NADPH. Las coenzimas reducidas producen en todos los casos una inactivación más rápida que las oxidadas. En cuanto a los nucleótidos de adenina, el orden de mayor a menor rapidez es AMP>ADP>ATP.

Tabla 2. Cinética de la inactivación de la BADH de hoja de amaranto por incubación^a con sus ligandos

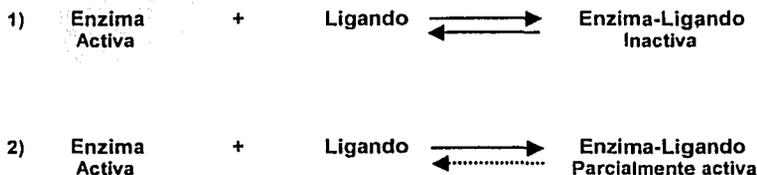
| Ligando | Actividad residual ^b (% inicial) | k (min ⁻¹) ^b | $t_{1/2}$ (min) |
|------------------------|--|---------------------------------------|-----------------|
| Betaína aldehído 5 mM | 41.7 ± 1.6 | 0.100 ± 0.014 | 6.95 ± 1.00 |
| Glicina betaína 50 mM | 79.3 ± 1.1 | 0.211 ± 0.067 | 3.28 ± 1.04 |
| NAD ⁺ 5 mM | 74.0 ± 1.6 | 0.027 ± 0.005 | 26.33 ± 5.12 |
| NADH 5 mM | 65.7 ± 2.9 | 0.043 ± 0.012 | 16.12 ± 4.47 |
| NADP ⁺ 5 mM | 85.0 ± 1.3 | 0.088 ± 0.037 | 7.91 ± 3.33 |
| NADPH 5 mM | 83.4 ± 1.9 | 0.126 ± 0.060 | 5.51 ± 2.64 |
| AMP 10 mM | 72.0 ± 2.3 | 0.041 ± 0.012 | 16.83 ± 4.86 |
| ADP 10 mM | 67.9 ± 3.3 | 0.026 ± 0.010 | 26.40 ± 9.55 |
| ATP 10 mM | 62.2 ± 3.4 | 0.023 ± 0.006 | 29.55 ± 7.49 |

^aLa enzima se incubó con diferentes ligandos según está descrito en Materiales y Métodos.

^bTanto la constante de velocidad de inactivación, k , como la amplitud del cambio (actividad residual) fueron estimadas a partir del ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales mostrados en la Figura 2 a la ecuación (1), descrita en Materiales y Métodos. Los valores mostrados son los estimados en el ajuste ± los errores estándares de los estimados.

VII. Resultados

En principio, esta cinética de pérdida de actividad puede ser el resultado de dos procesos diferentes, mostrados en el Esquema 1: (1) inactivación total reversible, lo que implica que al equilibrio sólo un porcentaje de las moléculas de enzima se han inactivado, y (2) inactivación parcial, lo que significa que la totalidad de la enzima se inactiva parcialmente, es decir, la enzima, tras la incubación con los ligandos, posee sólo una fracción de la actividad inicial. En este último caso la inactivación puede ser o no reversible.



Esquema 1. Posibles mecanismos de inactivación de la enzima por sus ligandos.

En el caso (2) la actividad residual de la enzima puede ser el resultado de: (a) la inactivación parcial e igual de los dos sitios activos con los que cuenta por molécula, o bien, de (b) la inactivación total de sólo uno de los sitios activos, lo que resultaría en una actividad del 50% de la inicial si todas las moléculas de enzima tuvieran unido al ligando.

VII. 2. 2. Dependencia de la cinética de inactivación de la concentración de betaína aldehído

Para investigar cuál de los dos posibles mecanismos de inactivación es el que tiene lugar, se determinó la cinética de inactivación en función de la concentración de betaína aldehído (Fig. 3A), ya que éste es el ligando que tuvo un efecto más claro.

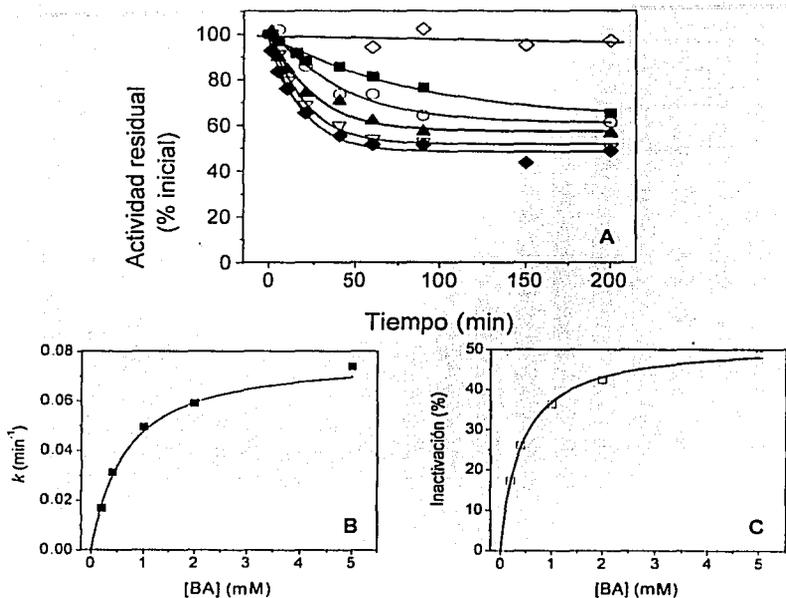
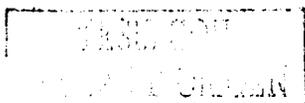


Figura 3. Dependencia de la inactivación de la BADH de hoja de amaranto de la concentración de betaína aldehído. A) Curvas de progreso de la reacción de inactivación de la enzima por incubación con: 0.2 (■), 0.4 (○), 1 (▲), 2 (▽) y 5 mM (◆) de betaína aldehído; enzima control no incubada con betaína aldehído (◇). B) Dependencia de la constante de velocidad de inactivación estimados a partir de los datos en el panel A. C) Dependencia de la concentración de betaína aldehído de inactivación. La concentración de enzima fue de 0.125 mg/mL.

Las Figuras 3B y 3C muestran que tanto la constante de velocidad como el grado de inactivación dependen de la concentración de betaína aldehído en una forma hiperbólica. Mediante el ajuste a una hipérbola equilátera de los valores de las constantes de velocidad y del porcentaje de inactivación estimados de las cinéticas de la Figura 3A, se determinó la constante de velocidad de inactivación máxima (k_{max}) y la inactivación al equilibrio máxima ($Inact_{e,max}$) a concentraciones saturantes de betaína aldehído, así como



VII. Resultados

las constantes de disociación del complejo enzima-betaina aldehído, mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros cinéticos^a de la inactivación de la BADH de hoja de amaranto por incubación^b con betaina aldehído

| Parámetro estudiado | K_d (mM) | k_{max} (min ⁻¹) | $Inact_{eqmax}$ (% actividad inicial) |
|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|--|
| Constante de velocidad (k_{obs}) | 0.401 ± 0.147 ^c | 0.064 ± 0.006 ^d | - |
| Inactivación al equilibrio | 0.409 ± 0.021 ^d | - | 51.9 ± 0.7 ^f |

^aParámetros estimados a partir del ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales mostrados en la Figura 3 a la ecuación de una hipérbola equilateral descrita en Materiales y Métodos (Ecuación 2). Los valores mostrados son los estimados en el ajuste ± los errores estándares de los estimados.

^bLa enzima se incubó con diferentes concentraciones de betaina aldehído según está descrito en Materiales y Métodos.

^c $K_d = k_{-1} / k_1$

^d $K_d = K_d = k_{-1} k_2 / k_1 (k_2 + k_3)$

^e $k_{max} = k_2 + k_3$

^f $Inact_{eqmax} = k_2 / k_2 + k_3$

Las constantes de velocidad son las indicadas en el Esquema 2.

A concentraciones saturantes de betaina aldehído sólo se pierde aproximadamente el 50% de la actividad y el $t_{1/2}$ máximo de la inactivación es de 9.8 min. El hecho de que sólo se pierda parte de la actividad incluso a saturación con el ligando a primera vista parece sugerir que el mecanismo (2) es el operante, y más en concreto el mecanismo (2b), dado que se pierde aproximadamente la mitad de la actividad. Sin embargo, la reacción de inactivación debe ser reversible, o de lo contrario se hubiese alcanzado el mismo grado de inactivación a todas las concentraciones de betaina aldehído, ya que éstas son muy superiores a la concentración de la enzima. Pero el hallazgo de una constante de inactivación máxima, k_{max} , nos indica que el mecanismo de inactivación no es tan simple como el mecanismo 1 reversible mostrado en el Esquema 1, sino que debe involucrar la formación reversible de un complejo intermediario Enzima-BA activo previo a la formación del complejo final, Enzima*-BA inactivo, como se muestra en el Esquema 2:

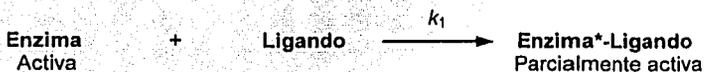




Esquema 2. Mecanismo propuesto para la inactivación de la BADH de hoja de amaranto por betaina aldehído.

Para fundamentar mejor nuestra propuesta de que éste es el mecanismo que tiene lugar, a continuación se describen las ecuaciones y los tipos de regráficos de la constante de velocidad y del grado de inactivación frente a la concentración del ligando que se obtendrían en los diferentes mecanismos posibles bajo condiciones de pseudoprimer orden (Fersht, 1999):

Caso 1) Inactivación parcial irreversible sin formación de un complejo intermedio:

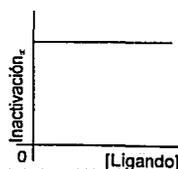
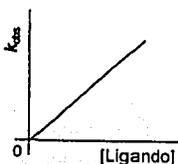


La constante de velocidad de inactivación observada, k_{obs} , es:

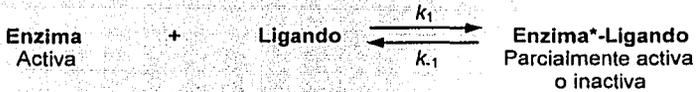
$$k_{\text{obs}} = k_1 [\text{L}],$$

siendo [L] la concentración de ligando

El grado de inactivación a tiempo infinito, Inact_∞ , medido como el cociente $[\text{E}^*\text{L}] / [\text{E}]_0$, siendo $[\text{E}]_0$ la actividad de la enzima al tiempo cero de incubación con el ligando, no depende de la concentración de éste. A cualquier concentración de ligando se alcanza la inactivación máxima puesto que toda la enzima se convierte en E^*L . Por tanto, la Inact_∞ sólo depende de la actividad que conserve este complejo.



Caso 2) Inactivación parcial reversible sin formación de un complejo intermediario:



La constante de velocidad de inactivación observada, k_{obs} , es:

$$k_{obs} = k_1 [L] + k_{-1}$$

Por tanto a $[L] = 0$

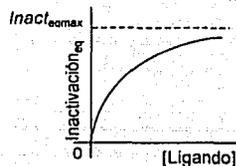
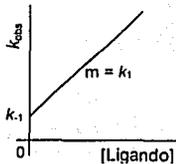
$$k_{obs} = k_{-1}$$

El grado de inactivación al equilibrio, $inact_{eq}$, para cada concentración de ligando es función de la concentración de éste:

$$inact_{eq} = \frac{[E^*L]_{eq}}{[E]_0} = \frac{k_1 [L]}{(k_{-1} + k_1 [L])} = \frac{[L]}{(K_d + [L])},$$

siendo $K_d = k_{-1} / k_1$.

A concentraciones infinitas de ligando toda la enzima estará como E^*L y la actividad residual dependerá de la actividad de este complejo.



Caso 3) Inactivación parcial con formación de un complejo intermediario, última reacción irreversible:



Suponiendo que la primera reacción es muy rápida comparada con la segunda, lo que muy probablemente sea cierto en el caso de la inactivación de la BADH inducida por sus ligandos, ambas reacciones pueden tratarse de forma separada. Suponemos además que la reacción de inactivación es la segunda.

La constante de inactivación efectiva depende de la fracción de enzima que esté como EL y puesto que la reacción 1 alcanza el equilibrio antes de que ocurra la reacción 2 y $[E]_0 = [E]_{total}$, tenemos que

$$[EL] / [E]_0 = [L] / (K_d + [L]),$$

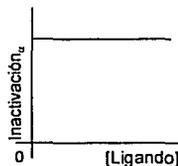
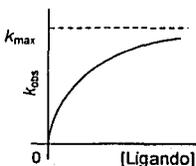
siendo $K_d = k_{-1} / k_1$,

y por tanto

$$k_{obs} = k_2 [L] / (K_d + [L])$$

A infinita concentración del ligando se observa una k_{max} que es igual a k_2

El grado de inactivación alcanzada a un tiempo infinito y a cualquier concentración de ligando es igual que en el caso 1, es decir, es constante y sólo depende de la actividad que conserve el complejo E*L.



Caso 4) Inactivación con formación de un complejo intermedio, última reacción reversible:



Haciendo los mismos supuestos que en el caso 3, y puesto que la reacción 2 de este mecanismo es reversible, la constante de inactivación observada es la suma de las constantes de inactivación de los dos pasos de esta reacción, como se mencionó en el caso 3. La constante de inactivación efectiva del paso EL E*L es $k_2 [L] / (K_d + [L])$. Por tanto,

$$k_{obs} = k_2 + k_2 [L] / (K_d + [L]),$$

siendo $K_d = k_{-1} / k_1$

Por tanto a $[L] = 0$

$$k_{obs} = k_2$$

VII. Resultados

A concentraciones infinitas de ligando la $k_{\max} = k_2 + k_2$

El grado de inactivación al equilibrio, $Inact_{eq}$, se define como:

$$\frac{[E^*L]_{eq}}{[E]_0},$$

$$\text{siendo } [E]_0 = [E]_{total} = [E]_{0eq} + [EL]_{eq} + [E^*L]_{eq},$$

es decir, la suma de las concentraciones de las diferentes formas de la enzima cuando se alcanza el equilibrio final.

Puesto que

$$\frac{[E^*L]_{eq}}{[EL]_{eq}} = k_2 / k_2 = K_{eq2},$$

siendo K_{eq2} la constante de equilibrio de la reacción 2

y

$$[EL]_{eq} = [E]_{0eq} [L] / K_d,$$

siendo la K_d la constante de disociación de la reacción 1, tenemos que,

$$\frac{[E^*L]_{eq}}{[E]_0} = \{[L] K_{eq2} / (1 + K_{eq2})\} / \{K_d / (1 + K_{eq2}) + [L]\}$$

Por tanto, el grado de inactivación al equilibrio también depende de la concentración de ligando, alcanzándose el máximo de inactivación a concentración infinita de éste:

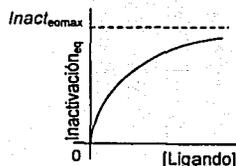
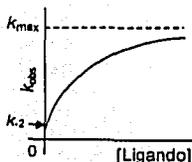
$$Inact_{eqmax} = K_{eq2} / (1 + K_{eq2}) = k_2 / (k_2 + k_2)$$

Cuanto mayor sea la K_{eq2} mayor será el grado de inactivación que se puede alcanzar.

La constante de disociación aparente, K'_d , que puede estimarse por un ajuste de los datos experimentales a una hipérbola equilátera, es inferior a la K_d del complejo EL:

$$K'_d = K_d / (1 + K_{eq2}) = k_1 k_2 / k_1 (k_2 + k_2)$$

Cuanto más alta sea K_{eq2} , la afinidad aparente por el ligando será mayor.



Caso 5) La unión del ligando desplaza el equilibrio preexistente entre dos formas de la enzima, activa e inactiva, hacia la forma inactiva:



Como en el caso 4, el cambio conformacional, que ahora es la primera reacción, sería lento, mientras que la reacción de unión del ligando sería mucho más rápida. La constante de velocidad de inactivación observada correspondería a la reacción primera y depende de la fracción de enzima inactiva que esté en forma E* y por tanto del equilibrio de la reacción segunda. Por tanto,

$$k_{\text{obs}} = k_1 + k_{-1} K_d / (K_d + [L]),$$

siendo $K_d = k_{-2} / k_2$

Por tanto a $[L] = 0$
 $k_{\text{obs}} = k_1 + k_{-1}$

La constante de velocidad del proceso de inactivación disminuye al incrementar la concentración del ligando, alcanzándose un valor mínimo, k_{min} , a concentración infinita de ligando:

$$k_{\text{min}} = k_1$$

Para cualquier concentración de ligando, el grado de inactivación al equilibrio, Inact_{eq} , se define como:

$$\text{Inact}_{\text{eq}} = [E_{\text{inact}}]_{\text{eq}} / [E]_{\text{total}} = ([E^*]_{\text{eq}} + [E^*L]_{\text{eq}}) / ([E]_{\text{eq}} + [E^*]_{\text{eq}} + [E^*L]_{\text{eq}}),$$

siendo $[E_{\text{inact}}]_{\text{eq}} = [E^*]_{\text{eq}} + [E^*L]_{\text{eq}}$

Puesto que,

$$[E^*L]_{\text{eq}} = [E^*]_{\text{eq}} [L] / K_d$$

y

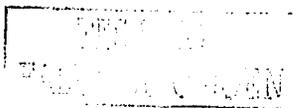
$$[E]_{\text{eq}} = [E^*]_{\text{eq}} / K_{\text{eq1}},$$

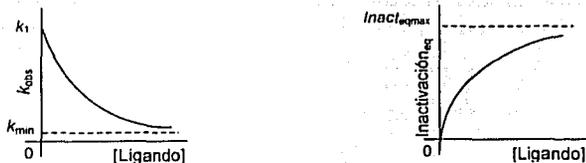
siendo $K_{\text{eq1}} = k_1 / k_{-1}$

El grado de inactivación al equilibrio, Inact_{eq} , también depende de la concentración de ligando, de acuerdo a:

$$\text{Inact}_{\text{eq}} = [L] / \{K_d (1 + K_{\text{eq1}}) + [L]\}$$

A concentración infinita del ligando toda la enzima estaría como complejo E*ligando y por tanto inactiva.





De este análisis claramente se puede concluir que el único mecanismo consistente con nuestros resultados es el descrito en el caso 4.

VII. 2. 3. Aditividad de los efectos máximos producidos por betaína aldehído y NADH

Para determinar si la presencia simultánea de dos ligandos produce la suma del efecto observado cuando están solos a concentraciones saturantes, se incubó la enzima con betaína aldehído 4 mM y NADH 4 mM para formar un complejo ternario no catalítico. Previamente, se había encontrado que el NADH a una concentración de 4 mM produce el efecto máximo sobre la actividad de la enzima. Se observó que los efectos de los dos ligandos no son aditivos (Fig. 4 y Tabla 4), si bien la constante de velocidad de inactivación parece ser mayor en presencia de ambos ligandos, el grado de inactivación es similar al obtenido, la presencia de ambos ligandos son similares a los obtenidos en presencia de la betaína aldehído.

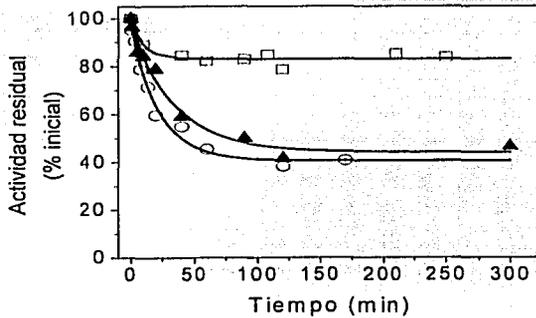


Figura 4. Efecto no aditivo de la betaína aldehído y NADH sobre la BADH de amaranto. La enzima fue incubada con: NADH 4 mM (□); betaína aldehído 4 mM (○); ó NADH 4 mM y betaína aldehído 4 mM (▲). La concentración de enzima fue de 0.25 mg/mL en el amortiguador de incubación.

Tabla 4. Inactivación de la BADH de hoja de amaranto por incubación^a simultánea con dos ligandos

| Ligando | Actividad residual (% inicial) ^b | k (min ⁻¹) ^b | $t_{1/2}$ (min) |
|-----------------------------------|---|---------------------------------------|-----------------|
| Betaína aldehído 4 mM | 40.4 ± 1.9 | 0.045 ± 0.005 | 15.30 ± 1.83 |
| NADH 4 mM | 83.0 ± 0.9 | 0.099 ± 0.038 | 6.99 ± 2.73 |
| Betaína aldehído 4 mM + NADH 4 mM | 43.9 ± 2.6 | 0.029 ± 0.005 | 24.07 ± 4.32 |

^a La enzima se incubó con los ligandos señalados según está descrito en Materiales y Métodos.

^b Parámetros cinéticos obtenidos a partir del ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales mostrados en la Figura 4 a la ecuación (1), descrita en Materiales y Métodos. Los valores mostrados son los estimados en el ajuste ± los errores estándares de los estimados.

VII. 2. 4. Reversibilidad de la inactivación

a) La inactivación no es reversible por dilución del ligando en el medio de ensayo

Para estudiar la reversibilidad de la inactivación de la enzima inducida por los ligandos, primero se investigó si la actividad se recuperaba al diluir el ligando 50 veces en el medio de ensayo. De esta forma se quería comprobar si el grado de inactivación de la enzima por sus ligandos es aun mayor al observado, debido a la presencia de una rápida

reactivación que acompaña a la disminución drástica de la concentración del ligando en la cubeta del espectrofotómetro, aunque esto no parecía probable, puesto que en ningún caso se había observado reactivación durante el ensayo de actividad, incluso si éste se prolongaba por tiempos largos (30 min). La enzima se preincubó con betaína aldehído 5 mM durante cinco horas para producir la inactivación máxima (Fig. 5A), tras lo cual se tomaron alícuotas que se preincubaron por diferentes tiempos (desde 0 hasta 180 min) con el medio de ensayo de actividad (HEPES KOH 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, β -mercaptoetanol 0.2 mM) sin los sustratos. La reacción se inició con la adición de los sustratos (betaína aldehído y NAD^+), una vez finalizados los tiempos de preincubación (Fig. 5B). La reactivación tampoco se observó tras 24 horas de incubación en el medio de ensayo (datos no mostrados). Como control, una alícuota de la enzima no tratada previamente con betaína aldehído se preincubó en el medio de ensayo, sin ligandos, por el mismo tiempo y bajo las mismas condiciones que las alícuotas de la enzima tratada con betaína aldehído.

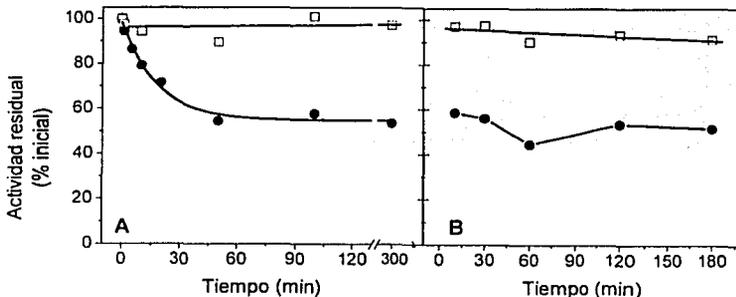


Figura 5. Incubación de la enzima BADH parcialmente activa y diluida 50 veces en el medio de ensayo. A) Inactivación de la BADH de hoja de amaranto con betaína aldehído 5 mM (●). B) Actividad tras la incubación de la enzima parcialmente inactiva en el medio de ensayo a los tiempos indicados (●). Enzima control (□). La concentración de enzima durante la preincubación con betaína aldehído fue de 0.125 mg/mL y durante la preincubación en el medio de ensayo de 0.0025 mg/mL.



Se esperaba que de revertirse la inactivación, la enzima recuperara su actividad por la dilución del ligando con el que se preincubó, ya que la concentración final de betaína aldehído, 0.08 mM, no produce inactivación significativa. Sin embargo, la actividad no se restauró: durante la incubación en el medio de ensayo las alícuotas de enzima mantuvieron la misma actividad que tenían al finalizar la preincubación con betaína aldehído (Fig. 5B). Este resultado mostró que el grado de inactivación que se obtenía no era menor al real y sugirió que la inactivación era irreversible.

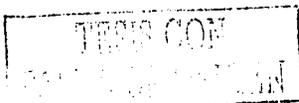
Si la inactivación de la enzima fuera causada por la disociación del dímero activo a monómeros inactivos inducida por los ligandos, los monómeros quizás no se reasociarían en la cubeta a una velocidad apreciable, dada la dilución a la que se somete a la enzima (50 veces). No obstante, como muestra la Figura 5B, la BADH de amaranto es bastante estable en el medio de reacción a una concentración similar a la que se tiene durante el ensayo.

Otra posible causa de la no reversibilidad por dilución en el medio de ensayo pudiera ser la baja concentración de un agente reductor en el medio, si es que la inactivación observada en presencia de los ligandos se debe a una oxidación parcial de la enzima. Aunque esta posibilidad parecía lejana, porque la inactivación por los ligandos se observa en presencia de 10 mM de β -mercaptoetanol, para descartarla se hicieron dos experimentos diferentes: 1) la enzima parcialmente inactivada por incubación con betaína aldehído 4 mM se diluyó en el amortiguador en el que se realiza la preincubación que contiene una concentración alta de reductor (β -mercaptoetanol 10 mM) y se midió la actividad en este amortiguador después de transcurridos 120 min de hacer la dilución. Tampoco se encontró reactivación. 2) Se incluyó DTT en el medio de ensayo, dado que el DTT, al ser un ditiol, es un reductor mucho más eficiente que el β -mercaptoetanol, un monotiol. Para nuestra sorpresa, la presencia de DTT en el medio de ensayo produjo una



VII. Resultados

actividad significativamente más baja, tanto de la enzima control (sin preincubar con betaína aldehído), como de la enzima parcialmente activa (preincubada previamente por 2 horas con betaína aldehído 4 mM), fueron más bajas que las determinadas comparada con la actividad determinada en ausencia del reductor. La disminución de la actividad provocada por el DTT se observó incluso sin haber incubado a la enzima en el medio de ensayo, es decir, se observó cuando la reacción se inició con la adición de la enzima, no con la adición de los sustratos. Así, la actividad de la enzima control fue 197.0 mU/mL en ausencia de DTT, 158.33 mU/mL en presencia de DTT 5 mM y 114.5 mU/mL en presencia de DTT 20 mM. Mientras que la de la enzima incubada con betaína aldehído fue de 101.5 mU/mL en ausencia de DTT, 65.66 mU/mL en presencia de DTT 5 mM y 42.0 mU/mL en presencia de 20 mM. Por tanto, la presencia de DTT a altas concentraciones en el medio de ensayo puede llegar a producir una actividad 40% más baja que si la medida de actividad se hace en su ausencia, lo que indica que bajo condiciones catalíticas la enzima es susceptible a la presencia de un reductor, aunque las razones de esta susceptibilidad no son claras por el momento. Sin embargo, la enzima parcialmente activa (tratada con betaína aldehído 4 mM por 2 horas) incrementa su actividad 2.11 veces con respecto a la que tenía después de haber sido incubada con betaína aldehído cuando se la incuba en el medio de ensayo en presencia de DTT 20 mM por 120 min, alcanzando un 72% de la actividad original. Cuando la concentración de DTT fue 5 mM se recuperó hasta un 70% de la actividad inicial, mientras que la actividad de la enzima tratada e incubada en medio de ensayo sin DTT no cambió significativamente (Fig. 6). Este resultado sugiere que la enzima sufre algún grado de oxidación reversible durante su incubación con el aldehído, aunque esta oxidación no explica el total de la pérdida de actividad. Otra posible explicación es que la enzima estuviera parcialmente oxidada al inicio del experimento y que estemos observando la reactivación de la fracción



de moléculas oxidadas, probablemente durante la extracción, purificación o almacenamiento de la enzima.

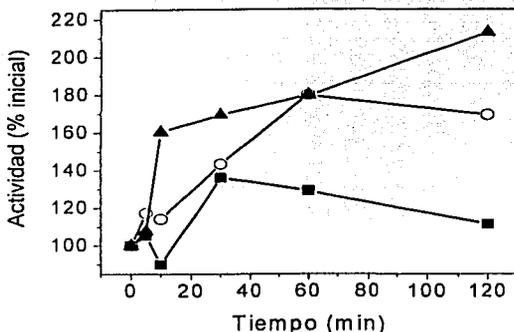


Figura 6. Efecto del DTT en el medio de ensayo sobre la reactivación de la BADH parcialmente inactiva por incubación con betaína aldehído. La enzima se preincubó con betaína aldehído 4 mM durante dos horas en el amortiguador C y después se diluyó 50 veces en el medio de ensayo con concentraciones de 0 (■), 5 (○) y 20 (▲) mM de DTT. La actividad se determinó por adición de los sustratos betaína aldehído y NAD⁺ a los tiempos indicados en la figura. La actividad inicial en este experimento (100%) es la determinada después de la preincubación de la enzima con betaína aldehído. La concentración de enzima durante la preincubación con betaína aldehído fue de 0.125 mg/mL y durante la incubación en medio de ensayo 0.0025 mg/mL.

b) La inactivación es reversible cuando se elimina totalmente el ligando del medio de incubación por filtración en gel o por diálisis

La enzima se inactivó parcialmente por incubación con betaína aldehído 4 mM, glicina betaína 200 mM ó NADH 1 mM, tras lo cual se eliminó el ligando por el método descrito por Penefsky (1979) mediante una rápida filtración en gel usando una columna de Sephadex G-25 equilibrada con el amortiguador C pero sin el ligando. Por este procedimiento, en los tres casos se recuperó la actividad específica inicial, es decir, la que la enzima posee antes de incubarse con el ligando, lo que indica que la inactivación causada por éste sí es reversible (Fig. 7 y Tabla 5).

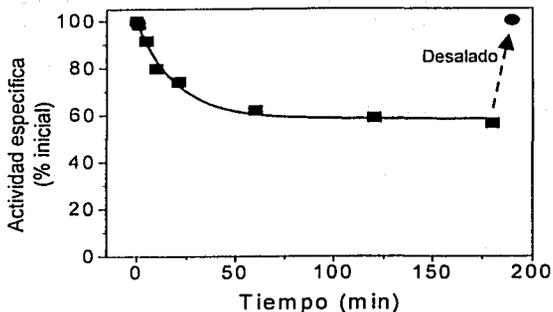


Figura 7. Reactivación de la enzima por eliminación del ligando por filtración en gel. Se inactivó parcialmente la enzima con betaína aldehído 4 mM durante tres horas y posteriormente se eliminó del medio la betaína aldehído por filtración en gel. La actividad específica se restituyó al 100% (flecha).

En este experimento se observó que cuando se pasaba a la preparación de enzima por la columna de filtración en gel se perdía proteína. La concentración de proteína y las unidades totales de enzima que se recuperan después de pasarla por la resina son menores que las adicionadas a la columna, aunque la actividad específica se recuperaba a los niveles iniciales. Parecía, por tanto, que lo que en realidad estaba sucediendo era que por alguna razón la proteína inactiva quedaba retenida en la columna. Esto nos llevó a estudiar la reversibilidad de la inactivación mediante una diálisis de la preparación de enzima inactivada durante 16 horas contra 1000 volúmenes del amortiguador de preincubación sin el ligando, betaína aldehído en este caso. Se encontró que también por este método la actividad enzimática se restituye al 100% (Tabla 5), sin que en este caso se pierda la proteína total.

Tabla 5. Reactivación^a de la BADH por filtración en gel y por diálisis

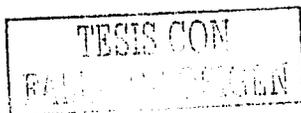
| Ligando | Actividad (% inicial) | | |
|------------------------|-----------------------|-----------------|-----------|
| | Incubada con ligando | Filtrada en gel | Dializada |
| Betaina aldehído 4 mM | 56 | 99 | - |
| Glicina betaina 200 mM | 82 | 103 | - |
| NADH 1 mM | 74 | 90 | - |
| Betaina aldehído 10 mM | 52 | - | 103 |

^a La actividad se encuentra expresada como el porcentaje de la actividad específica (U/mg prot.).

VII. 2. 5. Efecto de la temperatura en la cinética de inactivación por incubación con betaina aldehído

Otro parámetro que es importante determinar para la caracterización de la inactivación de la enzima por sus ligandos es la dependencia de la temperatura de la velocidad de dicha inactivación. En general, los aumentos de temperatura aceleran las reacciones químicas: por cada 10° C de incremento, la velocidad de reacción se duplica. Las reacciones catalizadas por las enzimas siguen esta ley general. Sin embargo, a partir de cierta temperatura, las proteínas se empiezan a desnaturalizar por el calor.

Se estudió el efecto de la temperatura, en el intervalo de 0 a 40° C, sobre la inactivación de la enzima por betaina aldehído 10 mM, que es una concentración saturante que permite observar el efecto máximo a 25° C y suponiendo que sigue siendo saturante en el intervalo de temperatura de este experimento. La cinética de inactivación mostró que la velocidad de pérdida de actividad se incrementa con la temperatura del medio de preincubación (Fig. 8 y Tabla 6), mientras que el grado de inactivación no se



VII. Resultados

afecta. En todos los casos la determinación de la actividad de la enzima preincubada se llevó a cabo a 30° C.

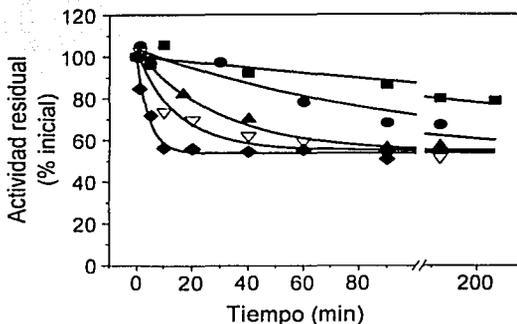


Figura 8. Cinéticas de inactivación de la enzima BADH de amaranto por incubación con betaina aldehído 10 mM en el intervalo de temperatura entre 0° C a 40°. Se muestran las cinéticas de inactivación de la enzima por preincubación con betaina aldehído 10 mM a: 0 (■), 10 (●), 20 (▲), 30 (▼) 40° C (◆) La concentración de enzima empleada fue de 0.125 mg/mL.

Tabla 6. Efecto de la temperatura sobre la cinética de la inactivación de la BADH de hoja de amaranto por incubación con betaina aldehído 10 mM

| Temperatura (°C) | Actividad residual ^a (% inicial) | k^a (min ⁻¹) | $t_{1/2}$ (min) |
|------------------|--|----------------------------|-----------------|
| 0 | 54 ^b | 0.003 ± 0.000 | 208.23 ± 34.05 |
| 10 | 54 ^b | 0.010 ± 0.002 | 67.81 ± 14.54 |
| 20 | 54.3 ± 2.9 | 0.034 ± 0.007 | 20.57 ± 4.15 |
| 30 | 55.1 ± 2.6 | 0.066 ± 0.016 | 10.48 ± 2.53 |
| 40 | 53.7 ± 1.7 | 0.216 ± 0.044 | 3.21 ± 0.65 |

^aTanto la constante de velocidad de inactivación, k , como la amplitud del cambio fueron estimadas a partir del ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales mostrados en la Figura 8 a la ecuación (1), descrita en Materiales y Métodos. Los valores mostrados son los estimados en el ajuste ± los errores estándares de los estimados.

^bPara hacer el ajuste en estas dos temperaturas, el valor de la amplitud del cambio se fijó a los valores mostrados.



VII. Resultados

Con las constantes de velocidad de inactivación de pseudo-primer orden estimadas a cada temperatura se realizó un análisis de Arrhenius para determinar la energía de activación de Arrhenius del paso (2) del proceso de inactivación (véase el Esquema 2 de la página 40). El gráfico del $\ln k_{\text{obs}}$ versus $1/T$ es lineal (Fig. 9), obteniéndose un valor de $17,350 \pm 731 \text{ cal mol}^{-1}$ ($72.60 \pm 3.06 \text{ kJ mol}^{-1}$).

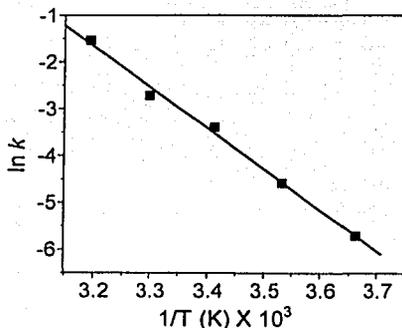


Figura 9. Dependencia de la temperatura de las constantes de velocidad de inactivación de la BADH de hoja de amaranto por incubación con betaína aldehído.

Se debe señalar que la enzima libre no es estable cuando se incubaba a 40°C por el periodo de tiempo que dura este experimento (datos no mostrados). Sin embargo, la enzima es estable cuando tiene unida a la betaína aldehído, por lo que la inactivación observada a esta temperatura se debe exclusivamente a la inactivación inducida por el ligando y no a la inactivación térmica. Para hacer esta afirmación nos basamos en la linealidad del gráfico de Arrhenius; de existir inactivación térmica a 40°C la constante de velocidad de inactivación tendría un valor superior al observado.

El valor de la energía de activación de Arrhenius calculado es similar al encontrado por otros en estudios de la dependencia de la temperatura de los cambios



conformacionales (Yaffe *et al.*, 1989; Renthal y Alaniz, 1999; Tiwari y Sikdar, 1999), lo que sugiere que el segundo paso del mecanismo propuesto por nosotros para la inactivación de la BADH de hoja de amaranto (Esquema 2, página 40) consiste en un cambio conformacional.

VII. 3. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA INACTIVACIÓN DE LA BADH DE AMARANTO POR SUS LIGANDOS

VII. 3. 1. Inactivación por oxidación de residuo(s) de cisteína

Las cisteínas tienen la capacidad de tolerar 10 ó más estados de oxidación diferentes *in vivo*. Como resultado, los péptidos y proteínas que contienen residuos de cisteínas pueden experimentar modificaciones por oxidación de éstas. A partir del tiolato, la forma desprotonada del monotiol, se pueden formar radicales tiolo, disulfuros, ácidos sulfénico, sulfinico o sulfónico (incluyendo sus bases conjugadas), -S-óxidos y disulfuros mixtos con otro tiol. Cada una de estas modificaciones químicas exhibe sus propias propiedades químicas y bioquímicas, tales como estabilidad, estado redox, capacidad de unir metales, acidez y nucleofilicidad, y de ocurrir en un grupo tiol que participa en catálisis, tienen importantes repercusiones sobre la actividad catalítica de la enzima (Gerber y Lill, 2002; Giles *et al.*, 2003). Las cisteínas, a pesar de ser los residuos de aminoácidos menos abundantes en las proteínas, son muy abundantes en la BADH de amaranto, que además de poseer una cisteína esencial para la catálisis tiene 15 residuos de cisteína por monómero.

En un principio se pensó que la inactivación se podría deber a la oxidación de la cisteína esencial (Cys294), la cual podía hacerse más reactiva y, por tanto, susceptible de oxidación, cuando algún ligando se ha unido a la enzima. De hecho, este incremento en la

reactividad del tiol de la cisteína catalítica se había observado en un estudio de modificación química usando disulfiram, un reactivo específico de tioles (Velasco-García *et al.*, 2003). Los resultados de reactivación en la cubeta por DTT mostrados anteriormente también apoyaban el que durante la incubación con los ligandos se produjese una oxidación de un(os) residuo(s) de cisteína.

Con base en estos antecedentes y pensando que al menos en parte la pérdida de actividad es causada por una oxidación, se exploraron las diversas posibilidades de oxidación de la enzima que se describen a continuación.

a) Oxidación por especies reactivas de oxígeno

Estudios en nuestro laboratorio habían mostrado que la BADH de hoja de amaranto se inactiva parcialmente por peróxido de hidrógeno. Esta inactivación se incrementa si la betaína aldehído está presente en el medio de incubación con peróxido y sigue una cinética muy semejante a la observada en la incubación con betaína aldehído. Aunque nos era difícil explicar cómo pudiera estar produciéndose H_2O_2 en nuestro medio de incubación, para descartar la posibilidad de que éste u otras especies reactivas de oxígeno estuvieran inactivando a la BADH cuando se incubaba con betaína aldehído, se hicieron los siguientes experimentos:

1) La enzima se incubó con betaína aldehído 10 mM en presencia de catalasa (50 unidades totales). La inactivación por betaína aldehído ocurre de la misma forma en presencia de catalasa que en ausencia de ésta, es decir, con la misma velocidad y magnitud (Fig. 10). Por lo tanto, se descartó que la inactivación se esté dando por oxidación con peróxido de hidrógeno.

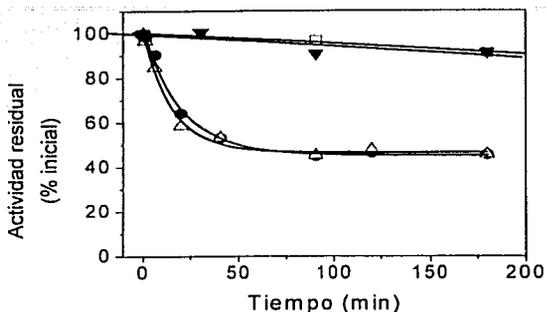
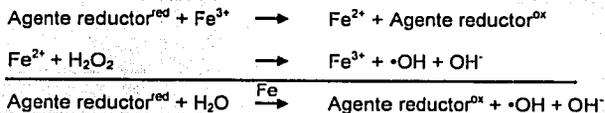


Figura 10. Inactivación de la BADH de amaranto por preincubación con betaína aldehído 10 mM en ausencia o presencia de catalasa. La enzima se incubó durante 180 minutos en presencia de: betaína aldehído 10 mM (●); betaína aldehído 10 mM y catalasa 50 U (△); ó catalasa 50 U (▼), como se describe en Materiales y Métodos. Enzima control no incubada con betaína aldehído (□).

2) Como las preincubaciones de la enzima con sus ligandos se hicieron en presencia de un agente reductor (β -mercaptoetanol 10 mM), pudiera ser que éste origine la formación de diferentes estados de oxidación de metales (traza) que pudieran estar promoviendo la inactivación de la enzima cuando se encuentra en presencia de sus ligandos. Se sabe que tanto el Cu^{2+} como el Fe^{2+} son capaces de reaccionar con el H_2O_2 para formar *in vitro* radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) por la reacción de Fenton. Si hay un reductor presente en el medio, se regenera el estado oxidado del metal y la reacción continúa. (Esquema 3) (Nappi y Vass, 1997; Lloyd, *et al.*, 1997; Park y Imlay, 2003).



Esquema 3: Reacción de Fenton. Tomado de Park e Imlay (2003).

VII. Resultados

Para investigar si la inactivación se debía a radicales hidroxilo, se preincubó la enzima con betaína aldehído 10 mM en presencia de cloruro férrico o cloruro ferroso con o sin EDTA. Nuestros resultados indican que ni Fe^{2+} ni Fe^{3+} incrementan la inactivación causada por la betaína aldehído y que la inactivación que producen por si mismos es siempre menor a la producida por el sustrato (Fig. 11 y 12). Se incluyó también a la catalasa para destruir cualquier traza de peróxido de hidrógeno del medio de incubación, la que se descartó que la inactivación se esté dando por oxidación con peróxido de hidrógeno.

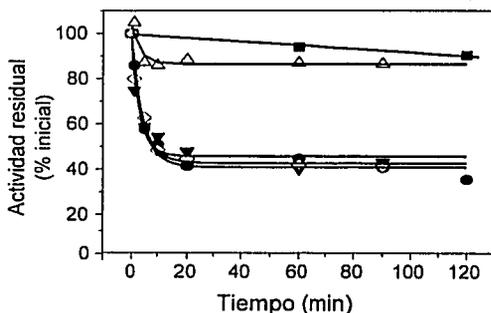


Figura 11. Inactivación de la BADH de amaranto por incubación con betaína aldehído 10 mM y cloruro férrico 5 μM en ausencia de EDTA. Enzima no incubada con betaína aldehído (■); enzima en presencia de FeCl_3 5 μM (Δ), enzima incubada con betaína aldehído 10 mM (●); enzima incubada con betaína aldehído 10 mM en presencia de FeCl_3 5 μM (∇); enzima incubada con betaína aldehído 10 mM en presencia de FeCl_3 5 μM y catalasa (\diamond). La concentración de enzima en todas las incubaciones fue de 0.25 mg/mL.

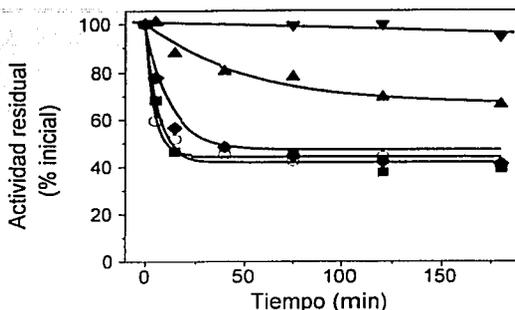


Figura 12. Inactivación de la BADH de amaranto por incubación con betaina aldehído 10 mM y cloruro ferroso 5 µM en ausencia de EDTA. Enzima no incubada con betaina aldehído (▼), enzima en presencia de FeCl₂ 5 µM (▲), enzima incubada con betaina aldehído 10 mM (■), enzima incubada con betaina aldehído 10 mM en presencia de FeCl₂ 5 µM (○), enzima incubada con betaina aldehído 10 mM en presencia de FeCl₂ 5 µM y catalasa (◆). La concentración de enzima en todas las incubaciones fue de 0.25 mg/mL.

b) Oxidación por oxígeno molecular

Con la finalidad de indagar el papel que juega el oxígeno como posible agente oxidante en el proceso de inactivación de la enzima por incubación con sus ligandos, se preincubó a la enzima con betaina aldehído 10 mM en condiciones anaeróbicas. La enzima se desaló en una columna de filtración en gel para eliminar el reductor (β-mercaptoetanol). Para mantener la enzima en condiciones anaerobias se desgasificó la preparación enzimática por vacío y se burbujeó nitrógeno durante 10 min, como se describe en Materiales y Métodos. Asimismo, todas las soluciones empleadas fueron desgasificadas y luego burbujeadas con nitrógeno. Se encontró que bajo estas condiciones sigue ocurriendo una pérdida de actividad por incubación con betaina aldehído semejante a la que ocurre cuando se incubaba a la enzima con este sustrato en presencia de oxígeno (Fig. 13) y que el grado de inactivación y la velocidad de ésta son muy similares a las observadas en presencia de oxígeno y reductor. Ésta fue la prueba

VII. Resultados

más contundente de que la inactivación de la enzima por sus ligandos no involucra una oxidación. Este hallazgo permitió, además, descartar la formación de un disulfuro mixto entre la cisteína catalítica y el reductor, puesto que este experimento se realizó en ausencia de reductor.

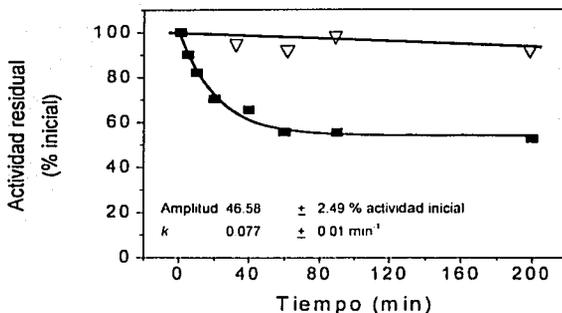
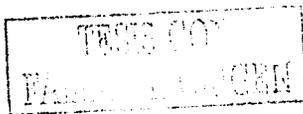


Figura 13. Inactivación de la BADH de amaranto por incubación con betaína aldehído 4 mM en ausencia de O₂ y de agente reductor. La incubación se realizó en amortiguador C carente de β-mercaptoetanol. Enzima control (▽). La concentración de enzima fue de 0.25 mg/mL.

Otra forma de descartar la posibilidad de que la inactivación se deba a oxidación por el oxígeno molecular, fue realizando las preincubaciones en presencia de agentes reductores bajo condiciones aerobias. Se siguió la inactivación de la enzima provocada por la incubación con betaína aldehído en presencia de diferentes concentraciones de DTT (estas mismas concentraciones también se llevaron a la cubeta en la que se realizó la lectura). Aun en presencia de DTT 20 mM ó β-mercaptoetanol 40 mM sigue habiendo inactivación de la enzima, pero en menor grado que la obtenida a bajas concentraciones de reductor (Fig. 14 y Tabla 7). En ausencia del ligando, la enzima es estable durante el tiempo que dura el experimento en un medio que contiene concentraciones tan bajas de β-mercaptoetanol como 0.2 mM. Experimentos posteriores mostraron que la enzima se



oxidada parcialmente durante el almacenamiento, lo que explica las diferencias de actividad encontradas con los reductores. En presencia de altas concentraciones de éstos, se produce la reactivación de la enzima oxidada por almacenamiento, simultáneamente a la inactivación por la incubación con el ligando.

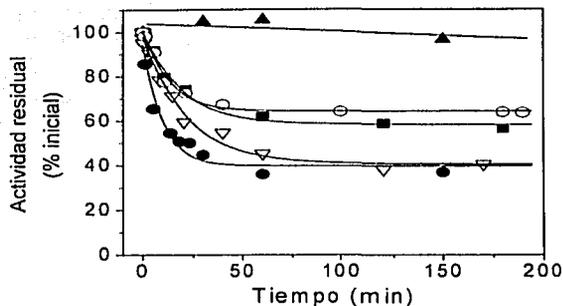
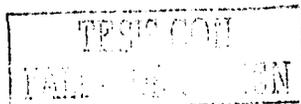


Figura 14. Inactivación de la BADH por incubación con de betaína aldehído 4 mM en presencia de agentes reductores: β -mercaptoetanol 0.2 mM (●), 10 mM (▽), ó 40 mM (○); DTT 20 mM (■). Actividad de la enzima control (no preincubada con el ligando) en presencia de β -mercaptoetanol 0.2 mM (▲). La concentración de enzima fue de 0.25 mg/mL.

Tabla 7 . Efecto de la concentración de agentes reductores en la inactivación de la BADH de hoja de amaranto por la betaína aldehído^a

| Reductor | Actividad residual (% inicial) | k (min^{-1}) | $t_{1/2}$ (min) |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------|
| β -mercaptoetanol 0.2 mM | 39.8 ± 3.1 | 0.104 ± 0.025 | 6.67 ± 1.57 |
| β -mercaptoetanol 10 mM | 40.5 ± 1.9 | 0.046 ± 0.006 | 15.30 ± 1.83 |
| β -mercaptoetanol 40 mM | 64.2 ± 1.0 | 0.077 ± 0.010 | 9.07 ± 1.10 |
| DTT 20 mM | 58.2 ± 1.3 | 0.051 ± 0.007 | 13.57 ± 1.82 |

^aLa enzima (0.25 mg/mL) se incubó durante 180 min en presencia de betaína aldehído 4 mM bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos en presencia de las concentraciones de los reductores indicadas.



VII. 3. 2. Punto isoeléctrico de la BADH inactivada por betaina aldehído

Para explorar si la inactivación de la enzima por incubación con betaina aldehído produce alguna modificación en ella que altere su *pI*, se realizó un electroenfoque en geles de poliacrilamida, con un gradiente de pH de 4-6.5, de la enzima no incubada y de la incubada con betaina aldehído. El punto isoeléctrico teórico de la BADH de hoja de amaranto es de 5.4, tanto para la enzima codificada por el gen *ahybadh4* como para la codificada por el gen *ahybadh17*.

El electroenfoque reveló el mismo comportamiento de la enzima control (sin preincubar) y de la enzima parcialmente activa por preincubación previa con la betaina aldehído (Fig. 22). Sorprendentemente, se encontraron tres bandas de proteínas en estos geles, lo que podría ser el resultado de las condiciones no reductoras de la corrida, que pudieran estar favoreciendo diferentes estados de oxidación de la enzima, o bien deberse a que nuestra preparación de enzima, que es altamente homogénea en SDS-PAGE, presenta heterogeneidad de *pI* por razones desconocidas en este momento. Otra posible explicación es la formación de heterodímeros correspondientes a los dos genes existentes aunque el análisis teórico indique que son iguales.

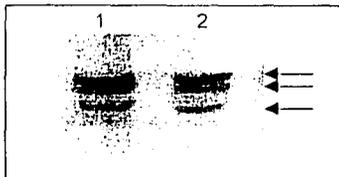


Figura 22. Electroenfoque de la BADH de amaranto en gel de poliacrilamida con un gradiente de pH de 4-6.5. Carril: 1) Enzima sin preincubar. 2) Enzima preincubada con betaina aldehído 10 mM.

La posibilidad de que la heterogeneidad sea un artefacto del procedimiento del electroenfoque impide concluir con certeza si la betaina aldehído está alterando el *pI* de la enzima, porque de hacerlo podría este efecto estar enmascarado.

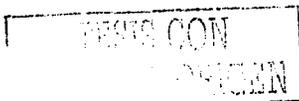
VII. 3. 3. Efecto de la incubación con betaina aldehído en la fluorescencia de la enzima

Puesto que la incubación de la enzima con sus ligandos produce una disminución en la actividad que refleja posiblemente cambios conformacionales inducidos por unión de los ligandos, se quiso explorar si estos cambios conformacionales producían cambios en la fluorescencia intrínseca y extrínseca, medidas por la fluorescencia de los triptofanos y del ANS, respectivamente. Estos experimentos se realizaron únicamente con la enzima incubada con betaina aldehído, puesto que es el ligando que produce la respuesta máxima y no interfiere con la fluorescencia, como es el caso del NADH.

a) Fluorescencia intrínseca

Se excitó la preparación enzimática a 296 nm para recoger el espectro de emisión de fluorescencia en un intervalo de 300 a 450 nm. Se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia intrínseca medida a la longitud de onda de máxima emisión después de la adición de betaina aldehído 10 mM a la preparación de enzima (Fig. 15). Este incremento ocurre durante los primeros minutos de la incubación, alcanza un máximo a los 20 min. y se mantiene constante hasta 2.5 h después de iniciada la incubación con el ligando. La longitud de onda máxima (λ_{\max}) se mantuvo constante durante todo el transcurso del experimento a un valor de 345.2 nm. Los cambios no son muy claros, posiblemente debido a que la enzima cuenta con once residuos de triptófano por monómero. De éstos, tres están en o cerca del sitio activo de acuerdo a nuestro modelo tridimensional de la enzima (González-Segura y Muñoz-Clares, datos sin publicar).

La cinética del cambio en la intensidad de fluorescencia permitió calcular una constante de velocidad (Fig. 16), ya que este cambio sigue un crecimiento exponencial sencillo. La constante de velocidad calculada con los cambios en la fluorescencia



intrínseca es aproximadamente 5 veces mayor a la calculada en la cinética de la pérdida de la actividad enzimática, por lo que no es fácil correlacionar ambos procesos.

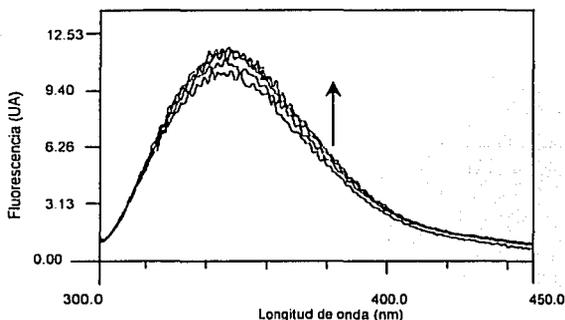


Figura 15. Efecto de la incubación de betaína aldehído sobre la fluorescencia intrínseca de la BADH de hoja de amaranto El incremento de la fluorescencia después de la adición de la betaína aldehído 10 mM se da en el sentido que indica la flecha. La $\lambda_{excitación}$ fue de 296 nm. La concentración de enzima empleada fue de 0.125 mg/mL.

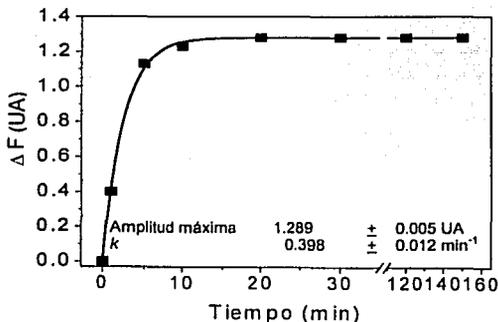
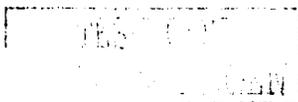


Figura 16. Cinética del cambio en la intensidad máxima de fluorescencia de la BADH de hoja de amaranto incubada con betaína aldehído 10 mM. El cambio en la fluorescencia fue calculado como se describe en Materiales y Métodos.



VII. Resultados

b) Fluorescencia extrínseca

Cuando se utilizó el ANS como un reportero de los cambios conformacionales inducidos por betaina aldehído la respuesta obtenida fue muy pobre. No obstante, se observó que la enzima es capaz de unir al ANS, lo que provoca un significativo incremento en su fluorescencia y que, al momento de adicionar la betaina aldehído 10 mM, hay una respuesta rápida, incrementándose un poco la fluorescencia (Fig. 17A), pero esta fluorescencia se ve apagada con el transcurso del tiempo (Fig. 17B) hasta regresar a el estado inicial de fluorescencia (Fig. 17C). Se obtuvieron los datos de longitud de onda de emisión máxima (λ_{max}) e intensidad máxima para cada trazo que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Evolución temporal de los espectros de fluorescencia extrínseca^a de la BADH de hoja de amaranto incubada con betaina aldehído (BA).

| Condición | Tiempo (min) | No. de espectro | λ_{max} (nm) | Intensidad _{max} (UA) |
|-------------------------|--------------|-----------------|----------------------|--------------------------------|
| Enzima | 0 | 1 | 478 | 0.58 |
| Enzima + ANS | 0 | 2 | 492 | 1.46 |
| Enzima + ANS + BA 10 mM | 1 | 3 | 484 | 1.57 |
| Enzima + ANS + BA 10 mM | 5 | - | 486 | 1.52 |
| Enzima + ANS + BA 10 mM | 10 | - | 490 | 1.49 |
| Enzima + ANS + BA 10 mM | 20 | - | 490 | 1.48 |
| Enzima + ANS + BA 10 mM | 40 | - | 492 | 1.47 |
| Enzima + ANS + BA 10 mM | 60 | 4 | 492 | 1.46 |

^a Los datos mostrados fueron obtenidos por inspección visual sobre el espectro de emisión.

La unión del ANS a la enzima produce un incremento en la fluorescencia (espectro 2), lo que indica que la molécula reportera se está uniendo a la enzima. Después de la adición de la betaina aldehído hay un ligero incremento de la fluorescencia y un corrimiento hacia el azul (espectro 3). A medida que transcurre el tiempo de incubación se

produce un regreso al estado original mostrado en el espectro 2. Así los espectros 2 y 4 son iguales.

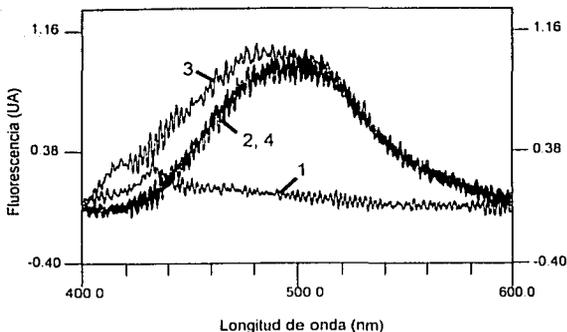


Figura 17. Efecto de la incubación con la betaína aldehído sobre el espectro de fluorescencia de la BADH de hoja de amaranto empleando ANS como fluoróforo. La $\lambda_{excitación}$ del ANS fue 360 nm. Enzima sola (1); BADH en presencia de ANS (2); BADH en presencia de ANS y de betaína aldehído 10 mM al tiempo cero (3) y a los 60 min después de añadir el aldehído (4).

Parece ser que la polaridad del microambiente se modifica al encontrarse en presencia de betaína aldehído, pero con el paso del tiempo la polaridad regresa a su estado original.

A pesar de que se encontraron diferentes respuestas por las dos pruebas de fluorescencia que se hicieron, es claro que se está produciendo un cambio conformacional de la enzima inducido por la incubación con betaína aldehído.

VII. 3. 4. Estado de agregación de la enzima inactivada por betaína aldehído

El posible efecto de la incubación de la enzima con sus ligandos sobre su estado de agregación se estudió por los siguientes métodos:

a) Filtración en gel

La enzima incubada con betaina aldehído 10 mM durante dos horas se cromatógrafió en una columna de exclusión molecular acoplada a un sistema de HPLC, equilibrada y eluida con el amortiguador de incubación (amortiguador C) conteniendo betaina aldehído 10 mM, como se describe en Materiales y Métodos. No se encontraron cambios en el estado de agregación de la enzima tras la incubación con betaina aldehído, ya que tanto la enzima no incubada con betaina aldehído como la incubada eluyen como un único pico simétrico (Fig. 18), con tiempos de retención similares: 29.8 min y 29.75 min, respectivamente.

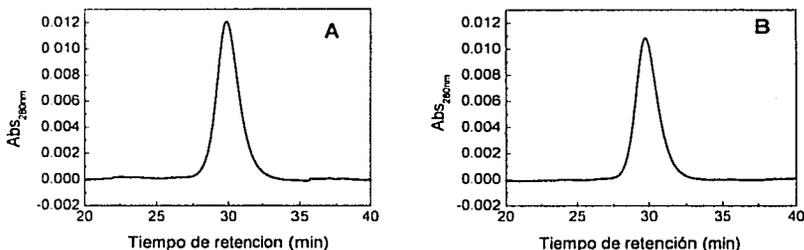


Figura 18. Perfiles de elución de la BADH de hoja de amaranto en una cromatografía de exclusión molecular. A) Enzima control no incubada con betaina aldehído. B) enzima incubada con betaina aldehído 10 mM durante dos horas para producir la inactivación parcial. La actividad de la enzima en A) es de 244.15 mU/mL y en B) de 110.92 mU/mL.

b) Entrecruzamiento con glutaraldehído

Los posibles cambios en el estado de agregación se investigaron también por entrecruzamiento con glutaraldehído de la enzima preincubada con y sin betaina aldehído 4 mM. El glutaraldehído es un agente entrecruzante que se une a los residuos de lisinas de las proteínas de manera covalente formando uniones intra e intermoleculares. Si la

VII. Resultados

betaina aldehído produce una agregación de la enzima, se esperaba poder verla en una SDS-PAGE tras el entrecruzamiento con el glutaraldehído. Sin embargo, y de acuerdo con el resultado de la cromatografía de exclusión molecular, no se encontraron diferencias cualitativas ni cuantitativas entre la enzima que se incubó con la betaina aldehído y la enzima que no fue incubada. Tampoco se encontraron agregados de masa molecular superior al dímero, lo que indica que la betaina aldehído no oligomeriza a la enzima BADH de hoja de amaranto (Fig. 19).

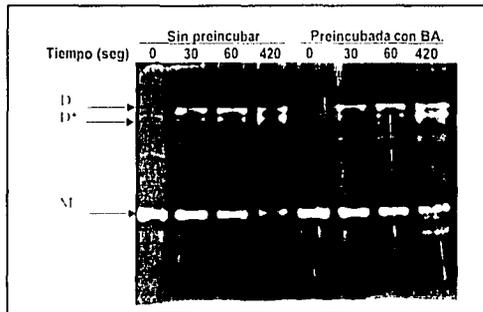


Figura 19. Entrecruzamiento con glutaraldehído de la BADH de hoja de amaranto sin preincubar y preincubada con la betaina aldehído. Las enzimas control y preincubada con betaina aldehído 4 mM se entrecruzaron con glutaraldehído 30 mM durante los tiempos señalados como se describe en Materiales y Métodos y se sometieron a SDS-PAGE de ambas muestras. El gel se tiñó con plata. Cada carril contiene 1 25 µg de proteína. M = monómero, D = dímero y D* = dímero entrecruzado intrasubunidad.

Se puede observar que el glutaraldehído produce la formación de dímeros que entrecruzan y corren de manera diferente en el gel. Esto posiblemente se debe a entrecruzamientos intrasubunidad que se producen a medida que transcurre la incubación con glutaraldehído.

c) Electroforesis nativa

Por medio de electroforesis nativa en geles preformados, con un gradiente de 4 a 15% de poliacrilamida, se corroboró que la inactivación producida por la betaina aldehído sobre la BADH de amaranto no se debe una agregación de la enzima, como se puede observar en la Figura 20. Se encontró que la BADH que ha sido preincubada con betaina aldehído 10 mM durante 120 min, y que ha perdido el 52% de su actividad original, corre de la misma forma que la enzima que no ha sido tratada. En esta electroforesis se observaron unas bandas débiles de proteína, correspondientes al tetrámero, tanto en el carril de la enzima control como en el de la tratada.

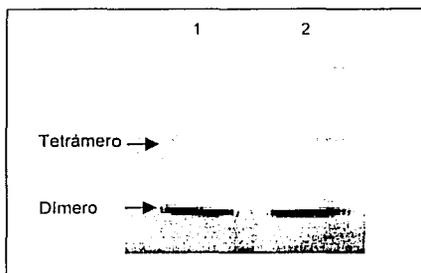


Figura 20. Electroforesis nativa de la BADH de hoja de amaranto en un gradiente de 4-15% de poliacrilamida. Carril 1: Enzima control no incubada con betaina aldehído; carril 2: enzima incubada con betaina aldehído 10 mM durante 120 min. En cada carril se aplicaron 0.25 µg de proteína totales. El gel se tiñó con plata como se describe en Materiales y Métodos.

VII. 3. 5. Estado de agregación de la enzima inactivada por glicina betaina

El experimento de filtración en gel anteriormente descrito para betaina aldehído se hizo también con glicina betaina. Se incubó a la enzima con 200 mM de glicina betaina durante tres horas, lo que llevó a la pérdida de aproximadamente el 30% de su actividad

VII. Resultados

original (Fig. 21A). La enzima parcialmente inactiva se sometió entonces a una cromatografía de filtración en gel en una columna acoplada a un sistema de HPLC, equilibrada con el mismo amortiguador en el que se encontraba la enzima, es decir, glicina betaína 200 mM. La cromatografía claramente demostró que la enzima se está agregando en tetrámeros inactivos (Fig. 21B). El porcentaje de enzima que se agrega, determinado como el área del pico del tetrámero con respecto a la suma de las áreas de los dos picos, es muy similar al porcentaje de enzima que se encuentra inactiva después de que se ha tratado con la glicina betaína. En este caso al menos, la velocidad y el grado de inactivación dependerán de la concentración de enzima, aunque esto no se ha determinado aún.

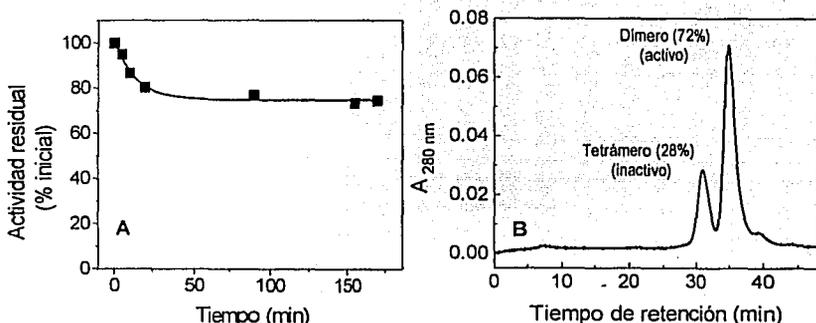


Figura 21. Efecto de la preincubación con la glicina betaína sobre la actividad (A) y estado de agregación (B) de la BADH de hoja de amaranto. La enzima (0.25 mg/mL) se incubó con glicina betaína 200 mM y después de 3 horas se examinó su estado de agregación por cromatografía de filtración en gel como se describe en Materiales y Métodos.

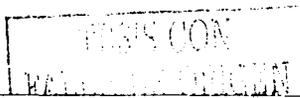
Por tanto, el mecanismo de la inactivación provocada por la glicina betaína es diferente al de la inactivación provocada por la betaína aldehído, lo que pudiera explicarse por un efecto fisicoquímico no específico de la primera, dadas las altas concentraciones de osmoprotector usadas en este experimento.

VIII. DISCUSIÓN

VIII. 1. MECANISMO CINÉTICO DE LA INACTIVACIÓN

La incubación de la enzima con sus ligandos produce una lenta inactivación dependiente de la concentración de éstos que alcanza una meseta después de transcurrido un tiempo. En el caso de la betaína aldehído se pudo establecer que a saturación con este ligando sólo se pierde aproximadamente el 50% de la actividad. Como se discutió en Resultados, los datos de inactivación obtenidos cualitativamente son consistentes con el mecanismo cinético mostrado en el Esquema 2 (página 40). Sin embargo, existen inconsistencias cuantitativas entre el modelo y los resultados obtenidos en las incubaciones de la enzima con betaína aldehído.

Por un lado, el mejor ajuste de la gráfica de k_{obs} versus $[L]$ se obtuvo a una hipérbola equilátera que pasa por el origen, lo que sugiere que el valor de la constante de velocidad de reactivación, k_2 , es muy pequeño. En este mismo ajuste se estimó un valor de k_{max} de $0.064 \text{ (min}^{-1}\text{)}$, valor que de ser cierta la conclusión anterior debería ser muy cercano al valor de k_2 , puesto que k_{max} es la suma de k_2 y k_2 . Por lo tanto, la K_{eq2} debería ser muy superior a 1 y, por consiguiente, la $Inact_{\infty max}$ mayor a la encontrada en el ajuste de los datos de $Inact_{\infty}$ versus la $[L]$. Si se supone que el complejo E^*L es totalmente inactivo, el valor estimado para la sugiere un valor de la K_{eq2} de 1, es decir que k_2 y k_2 serían iguales. Aunque el bajo valor estimado para $Inact_{\infty max}$ pudiera deberse a que el complejo E^*L fuese parcialmente activo, los valores de la K_d estimados en ambos ajustes, el de k_{obs} versus $[L]$ y el de $Inact_{\infty}$ versus $[L]$, deberían ser muy diferentes y no iguales como lo encontrado. Ello es porque el primer gráfico nos da el valor real de K_d , mientras que el segundo da una constante de disociación aparente, K'_d que es el cociente entre la real y $(K_{eq2} + 1)$. Aun en el caso de que K_{eq2} valiese 1, K'_d debería ser la mitad de la K_d . De hecho, probablemente por ser la K'_d mucho menor a la K_d no se observó reversibilidad de



la inhibición por dilución de la mezcla de incubación y sólo se observa reactivación cuando el ligando se elimina totalmente del medio en el que se encuentra la enzima.

Por estas razones creemos que será necesario hacer los experimentos con mayor precisión, ampliando el número de concentraciones de ligando y de los tiempos usados en las incubaciones, para poder estimar los parámetros cinéticos con mayor confiabilidad.

VIII. 2. BASES MOLECULARES DE LA INACTIVACIÓN POR LIGANDOS

Por el momento, es poco lo que se puede decir sobre las bases moleculares del mecanismo de la inactivación de la enzima inducida por su incubación con ligandos, con excepción de la inducida por la glicina betaína, que se debe a la asociación de los dímeros activos en tetrámeros inactivos. Sabemos que la inducida por betaína aldehído no involucra la oxidación de la cistena esencial y no conlleva cambios en el estado de agregación de la enzima. La inactivación parcial de la BADH de hoja de amaranto provocada por la incubación con cualquiera de sus ligandos pudiera ser el reflejo de un cambio conformacional reversible.

Son numerosas las enzimas que experimentan cambios conformacionales al unir a sus sustratos, cambios que generalmente forman parte del mecanismo catalítico y que se conocen como "ajustes inducidos" por los sustratos (Koshland *et al.*, 1958). Si estos cambios se limitan al sitio activo que ha unido el sustrato, el único indicio que por estudios de velocidad inicial puede tenerse de ellos es el observar un mecanismo cinético estrictamente ordenado en una reacción multisustrato, en la que se supone que la unión del primer sustrato produce re-arreglos del sitio activo que permiten la unión del segundo o sucesivos sustratos (Cleland, 1963; Segel, 1993). En las proteínas oligoméricas, si los cambios producidos en un sitio activo se transmiten a otros sitios activos vacíos afectando su capacidad de unir a los sustratos, se produce el fenómeno de cooperatividad entre los sitios, ya sea ésta positiva o negativa (Monod *et al.*, 1965; Koshland, 1958). Los cambios

conformacionales inducidos por ligandos que se observaron con la BADH de hoja de amaranto son diferentes a los casos mencionados, puesto que: 1) ocurren solamente bajo condiciones no catalíticas y 2) producen una inactivación lenta que sólo se revierte cuando se elimina totalmente el ligando. Por ello, se asemeja al fenómeno de inhibición por "unión lenta" (slow binding) del inhibidor, en el que la unión inicial, rápida, del inhibidor induce un cambio conformacional lento que lleva a una unión más fuerte entre la enzima y el inhibidor.

En el caso de la betaína aldehído, el complejo Enzima^{*}-BA podría ser resultado de la formación del tiohemiacetal con el tiol de la cisteína esencial, igual que ocurre durante el ciclo catalítico. Aunque la unión del aldehído con la enzima sea rápida, la reacción con el tiolato de la cisteína catalítica puede ser lenta cuando sólo está unido este sustrato a la enzima. Al no estar el NAD⁺ presente durante la formación de este complejo covalente Enzima-BA el nucleótido ya no podría entrar al sitio activo para dar el complejo ternario productivo, o si lo hace, lo haría en forma tal que no se pueda producir la transferencia del hidruro y la oxidación por tanto de la betaína aldehído. Se espera que la elucidación de la estructura tridimensional de la enzima permita probar esta hipótesis.

De ser éste el mecanismo molecular de la inactivación, ya a saturación por el ligando se alcanza un máximo de inhibición de aproximadamente 50% de la actividad inicial, pareciera que de los dos sitios activos que consta la molécula de BADH sólo uno de ellos participa en la formación del tiohemiacetal que conduce a la inhibición, lo que se conoce como una "reactividad de la mitad de los sitios".

Se han descrito varios ejemplos de este tipo de cooperatividad negativa extrema en otras aldehído deshidrogenasas, pero en estos casos la reactividad ha sido determinada frente a un reactivo específico de grupo que produce modificación química de algún residuo de aminoácido del sitio activo. Además, la modificación de un solo sitio activo en el caso de enzima diméricas o de dos sitios activos, en el caso de las

TRABAJOS CON
FINANCIAMIENTO
ORIGEN

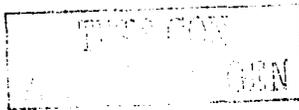
tetraméricas, conduce a la pérdida total de la actividad enzimática. Sin embargo, en nuestro caso parece que el otro sitio activo, si bien no es capaz de interactuar con el inhibidor (sustrato en este caso), si mantiene su capacidad catalítica íntegra. Para poder hacer esta afirmación con absoluta certeza se deben hacer estudios cinéticos de estado estacionario, que escapen al alcance de esta tesis, de manera que se determinen los parámetros cinéticos de la enzima inactivada por incubación con el ligando.

De probarse esta hipótesis, parecería que sólo se ocupa un sitio activo a la vez, es decir, que existe alternancia de los sitios en la catálisis, lo que podría ser la base de la reactividad de la mitad de los sitios. Por ello, el hallazgo de esta inactivación parcial por betaína aldehído puede ser de importancia para entender el mecanismo de reacción de las BADHs de plantas, de las cuales la enzima de amaranto es un ejemplo. A diferencia de la cooperatividad positiva, al fenómeno de reactividad de la mitad de los sitios, y en forma más general de cooperatividad negativa, no se le ha dado hasta el momento un significado fisiológico claro. En el caso de la BADH de hoja de amaranto si podría tenerlo, como se discute más adelante.

Claramente, este posible mecanismo de modificación covalente por el ligando no aplica a la inactivación inducida por los nucleótidos, que pudieran tener mecanismos de inactivación diferentes al de betaína aldehído, como lo tiene la glicina betaína. Se requiere más trabajo experimental para aclarar este importante aspecto.

VIII. 3. IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS DE LA INACTIVACIÓN DE LA BADH POR SUS LIGANDOS

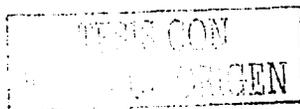
La inactivación de la BADH de hoja de amaranto por incubación con sus ligandos sólo se da cuando hay un solo ligando presente o cuando se forma un complejo ternario no productivo con dos ligandos (Enzima-B_A-NADH). No ocurre bajo condiciones catalíticas, lo que posiblemente se deba a que los sitios activos están ocupados



constantemente por los dos sustratos y la ocupación por un solo sustrato no se mantiene un tiempo suficientemente largo para dar lugar a la inactivación. Otra posible razón, no incompatible con la anterior, es que la unión de betaína aldehído a la enzima libre no sea igual que su unión al complejo E-NAD⁺ y que sólo en el primer caso se induce el cambio conformacional que lleva a la unión fuerte del aldehído, cualquiera que sea el mecanismo por el que ésta ocurre, y a la inactivación parcial de la enzima. Hay que recordar que el mecanismo cinético de la enzima es ordenado y que el NAD⁺ es el sustrato que se une en primer lugar (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993).

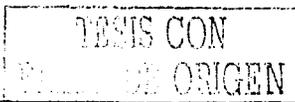
El posible significado fisiológico de la inactivación parcial de la enzima inducida por betaína aldehído sola o en presencia de NADH, cualquiera que sea el mecanismo molecular que la produce, sería el de evitar que un exceso del aldehído con respecto al NAD⁺ conduzca al agotamiento del nucleótido oxidado en el cloroplasto. En este organelo la poza del par NAD⁺/NADH no está en equilibrio con la del NADP⁺/NADPH, por lo que los niveles de NAD⁺ no se pueden regular mediante las reacciones fotosintéticas de asimilación del carbono. Hay que tomar en cuenta, además, que la reacción catalizada por la BADH es irreversible (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y que el producto ácido de la reacción, la glicina betaína, no inhibe significativamente, aún a altas concentraciones (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). El otro producto, el NADH, sí es un inhibidor y, lo que es más interesante, a diferencia de la mayoría de las deshidrogenasas conocidas, produce una inhibición mixta con respecto al NAD⁺. Esto significa que es un inhibidor más efectivo que si produjese inhibición competitiva (Cornish-Bowden, 1995).

Se ha hecho la analogía de una reacción irreversible a la de un coche sin frenos moviéndose cuesta abajo. Dejar a la reacción que proceda sin control sería catastrófico para la célula, porque podría llevar a un peligroso desbalance del par NAD⁺/NADH. Nuestra hipótesis, basada en los estudios que se presentan en esta tesis y en los estudios



cinéticos previos de nuestro laboratorio (Vojtechová *et al.*, 1997b; Muñoz-Clares y Mújica-Jiménez 2001), es que la betaína aldehído y el NADH actúan separada y conjuntamente aportando los frenos que la reacción necesita. No sólo la unión de cualquiera de ellos, específicamente betaína aldehído, a un sitio activo vacío provoca una inactivación parcial, lo que es una respuesta relativamente lenta, sino que ambos producen inhibición que se potencia, dado que la inhibición por el sustrato betaína aldehído ocurre principalmente por unión al complejo E-NADH. Esta inhibición ocurre a concentraciones de betaína aldehído saturantes para la reacción, similares a las que producen la inactivación máxima. De hecho, una concentración de betaína aldehído semejante a la K_d aparente encontrada en este trabajo para el efecto de betaína aldehído (.0401 mM), produce aproximadamente el 50% de la inhibición observada bajo las mismas condiciones de pH y temperatura (Vojtechová *et al.*, 1997b). De esta forma, un exceso de betaína aldehído tiene un doble efecto: inmediato, inhibiendo aun bajo condiciones catalíticas, y a más largo plazo, inactivando bajo condiciones no catalíticas. Ambos efectos son parciales, por lo que en ningún caso se llega a abolir la actividad de la enzima, y reversibles, pero la reactivación requiere una disminución en la concentración del aldehído hasta niveles más bajos que los requeridos para producir la inactivación.

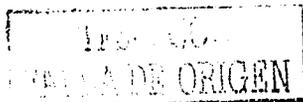
Igualmente, la inactivación por glicina betaína causada por agregación es posible que ocurra *in vivo*. En nuestros experimentos se usó una concentración de enzima muy por debajo de las que están presentes en el estroma de los cloroplastos, donde se estima que la concentración total de proteína es del 40% (p:p) (Ellis, 1979). Por tanto, es posible que a las altas concentraciones de glicina betaína que se llegan a alcanzar después de un período de estrés osmótico, sumado al bajo potencial de agua que caracteriza al medio intracelular de una célula sometida a estrés, favorezcan las interacciones proteína-proteína y la proporción de BADH en forma tetramérica inactiva sea alta.



VIII. Discusión

Los efectos negativos de los ligandos sobre la actividad de la BADH, que es de esperar se produzcan en forma significativa después de un periodo de estrés osmótico, podrían ser las causantes del fenómeno observado de que la acumulación de glicina betaína sólo tiene lugar en las primeras horas de estrés (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares 1994). Después de este tiempo, se empieza a acumular prolina, que sí es metabolizable y por tanto puede ser usada por la planta una vez que se superan las condiciones adversas.

Cada vez es más claro que la síntesis del osmoprotector glicina betaína requiere de un control estricto para evitar no sólo la síntesis incontrolada de este compuesto, que al no metabolizarse posteriormente puede significar un desperdicio de carbono y nitrógeno, sino también situaciones potencialmente catastróficas, como sería el agotamiento del NAD^+ intracloroplástico. Para tener una visión completa de la regulación de la vía cloroplástica de síntesis de glicina betaína, una vía corta que involucra sólo a dos reacciones, será necesario no sólo completar los estudios de regulación de la BADH, sino comenzar a estudiar también la regulación de la enzima que la precede, la CMO. Asimismo, se requiere determinar los niveles intracloroplásticos de betaína aldehído, NAD^+ y NADH y los cambios que estos niveles experimentan a medida que el estrés transcurre.



**IX. RESUMEN DE RESULTADOS Y
CONCLUSIÓN GENERAL**

TESIS CON
VALOR DE ORIGEN

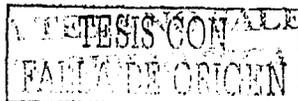
77.A

RESUMEN DE RESULTADOS

- La incubación de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de hoja de amaranto con ligandos (betaína aldehído, glicina betaína NAD⁺, NADH, AMP, ADP y ATP) produce una inactivación parcial de la enzima que sigue una cinética de pseudoprimer orden.
- La constante de velocidad y el grado de inactivación depende hiperbólicamente de la concentración de ligando, indicando la formación de un complejo E-Ligando intermediario.
- La preincubación de la enzima con los ligandos betaína aldehído y NADH no es aditiva. Cuando ambos ligandos están presentes producen la misma inactivación máxima que cuando sólo lo está la betaína aldehído.
- La inactivación se revierte cuando se retiran los ligandos por diálisis o por filtración en gel del medio de preincubación; sin embargo, no se pudo revertir cuando el ligando se diluye en el medio de ensayo.
- La inactivación por betaína aldehído es independiente de la presencia de oxígeno; no se debe a la formación de peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo durante la preincubación.
- La inactivación por betaína aldehído no se debe a cambios en el estado de agregación de la enzima, pero sí la producida por glicina betaína
- La incubación de la enzima con betaína aldehído produce cambios mínimos en el espectro de fluorescencia, que parecen indicar posibles cambios conformacionales propios del sitio activo.

CONCLUSIÓN GENERAL

En el caso de la BADH de hoja de amaranto se encontró que en condiciones no catalíticas existe una regulación por sus ligandos. Esta regulación conlleva a una pérdida parcial y reversible de la actividad catalítica. Esta regulación, unida a la que ejercen los ligandos en condiciones catalíticas, podría ser de gran importancia para evitar que la célula sufra un desbalance metabólico.



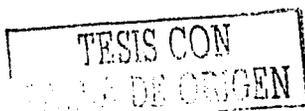
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

TESIS COM
VALLE DE ORIGEN

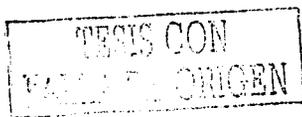
79-A

X. Referencias bibliográficas

- Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E. y Vrielink, A. (2000). Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochem. J.* **349**:853-861.
- Ambroziak, W. y Pietruszko, R. (1991). Human aldehyde dehydrogenase: activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* **266**:13011-13018.
- Arakawa, T. y Timasheff, S.N. (1983). Preferential interactions of proteins with solvent components in aqueous amino acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.* **224**: 169-177.
- Biggers, J.D., Lawitts, J.A. y Lechene, C.P. (1993). The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **34**: 380-390.
- Bohnert, H.J. Nelson, D.E. y Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* **7**: 1099-1111.
- Bohnert, H.J. y Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotech.* **14**: 89-97.
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Cleland (1963). The kinetics on enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: III. Prediction of initial velocity and inhibition patterns by inspection. *Biochim. Biophys. Acta* **67**: 188-196.
- Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, Branlant, G. y Aubry, A. (2000). Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* **300**: 141-152.
- Cornish-Bowden A. (1995). *Fundamentals of Enzyme Kinetics* (2a edn.), Portland Press, London.
- De la Cruz, G.G. (1991). Evaluación de las respuestas morfológicas de *Amaranthus hypochondriacus* L. sometidos a dos niveles de sequía. Tesis de Maestría, Posgrado de Ciencias Biológicas, FES Iztacala, UNAM, México.
- Du Vigneaud, V., Simmonds, S., Chandler, J.P. y Cohn, M. (1946). A further investigation of the role of betaine in transmethylation reactions *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **165**: 639-648.
- Ellis, R. J. (1979). The most abundant protein in the world. *Trends Biochem. Sci.* **4**: 241-244.

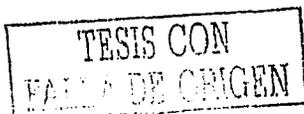


- Falkenberg, P. y Strom, A. R. (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli* Biochim. Biophys. Acta 1034: 253-259.
- Farrés, J., Wang, T., Cunningham, J. y Weiner, H. (1995). Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. Biochemistry 34: 2592-2598.
- Fersht, A. (1999). Structure and mechanism in protein science (3a edn.), Freeman and Company, New York.
- Flores-Zenil, M. (1994). Rendimiento, calidad nutricional y volumen de expansión de grano en cinco colectas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) sometidas a fertilización potásica. Tesis, Universidad Nacional Autónoma de Chapingo, Departamento de Fitotecnia. 260pp
- Gamboa, A., Valenzuela-Soto, E.M. y Murillo, E. (1991). Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. J. Plant Physiol. 137: 586-590.
- Gerber, J. y Lill, R. (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. Mitochondrion 2: 71-86.
- Giles, N.M., Giles, G.I. y Jacob, C. (2003). Multiple roles of cysteine in biocatalysis Biochem. Biophys. Res. Commun. 300: 1-4.
- Guzmán-Partida, A.M. y Valenzuela-Soto, E.M. (1998). Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 119: 485-491.
- Hanson, A.D., Rivoal, J., Paquet, L. y Gage, D.A. (1994). Synthesis of 3-dimethyl sulfoniopropionate in *Wollastonia biflora*: evidence that S-methylmethionine is an intermediate. Plant Physiol. 105: 103-110.
- Hare, P.D., Cress, W.A. y Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environ. 21:535-553.
- Hauser, M., Eichelmann, H., Oja, V., Heber, U. y Laisk, A. (1995). Stimulation by light of rapid pH regulation in the chloroplast stroma in vivo as indicated by CO₂ solubilization in leaves. Plant Physiol. 108: 1059-1066.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. (1998). Núcleos Agrarios. Tabulados básicos por municipio. Programa de certificación de derechos ejidales y Titulación de solares, procede, abril 1992-agosto 2002. Concentrado nacional.
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jorvall, H. y Eklund, H. (1998). Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. Protein Sci. 7: 2106-2117.
- Kshitani, S., Watanabe, K., Yasuda, S., Arakawa, K. y Takabe, T. (1994). Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and-freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. Plant Cell Environ. 17: 89-95.



X. Referencias bibliográficas

- Koshland, D.E. (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 44: 98-104.
- Kutzenko, A.S., Lamzin, V.S. y Popov, V.O. (1998). Conserved supersecondary structural motif in NAD-dependent dehydrogenases. FEBS Lett. 423: 105-109.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M.W., Falkenberg, P., McDougall, J. y Strom, A.R. (1991). DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5: 1049-1064.
- Legaría, J., Rajsbaum, R., Muñoz-Clares, R.A., Villegas-Sepúlveda, N., Simpson, J. y Iturriaga, G. (1998). Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. Gene 218: 69-76.
- Liu, Z., Sun, Y., Rose, J., Chung, Y., Hsiao, C., Chang, W., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. y Wang, B. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. Nat. Struct. Biol. 4: 317-326.
- Lloyd, R.V., Hanna, P.M. y Mason, R.P. (1997). The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. Free Radic. Biol. Med. 22: 885-888.
- Marchal, S., Cobessi, D., Rahuel-Clermont, S., Tête-Favier, F., Aubry, A. y Branlant, G. (2001). Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. Chem. Biol. Interact. 130-132: 15-28.
- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J-P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12: 88-118.
- Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y., y Yamada, H. (1980). Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum didymum* M-1. Agric. Biol. Chem. 44: 3015-3016.
- Mori, N., Yoshida, N. y Kitamoto, Y. (1992). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. J. Ferment. Bioeng. 73: 352-356.
- Muñoz-Clares, R.A. y Mújica-Jiménez, C. (2001). Complexes of NADH with betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of the plant *Amaranthus hypochondriacus* L. Chem. Biol. Interact. 130-132: 71-80.
- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y. y Ogata, K. (1976). Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. Agr. Biol. Chem. 39: 1513-1514.



- Nappi, A.J. y Vass, E. (1997). Comparative studies of enhanced iron-mediated production of hydroxyl radical by glutathione, cysteine, ascorbic acid, and selected catechols. *Biochim. Biophys. Acta* **1336**: 295-302.
- Nuccio, M.L., Rhodes, D., McNeil, S.D. y Hanson, A.D. (1999). Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:128-134.
- Nyyssölä, A., Kerovu, J., Kaukinen, P., von Weymar, N. y Reinikainen, T. (2000). Extreme halophiles synthesize betaine from glycine by methylation. *J. Biol. Chem.* **275**: 22196-22201.
- Park, S. y Imlay, J.A. (2003). High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction. *J. Bacteriol.* **185**: 1942-1950.
- Penefsky, H.S. (1979). A centrifuged-column procedure for the measurement of ligand binding by beef heart F1. *Meth. Enzymol.* **56**:527-530.
- Petronini, P.G.M., de Angelis, E., Borghetti, P., Borghetti, A.F. y Wheelers, K.P. (1992). Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochem. J.* **282**: 69-73.
- Pocard, J.A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L.T., Poggi, M.C. y Le Rudulier, D. (1997). Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in *Sinorhizobium meliloti* 102F34. *Microbiology* **143**: 1369-1379.
- Renthal R, y Alaniz C. (1999). Conformational change in bacterio-opsin on binding to retinal. *Biophys. Chem.* **78**: 241-245.
- Rhodes, D. y Hanson, A.D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384.
- Sakamoto, A. y Murata, N. (2000). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J. Exp. Bot.* **342**: 81-88.
- Sakamoto, A. y Murata, N. (2002). The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: clues from transgenic plants. *Plant Cell Environ.* **25**: 163-171.
- Schobert B. (1977). Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? *J. Theor. Biol.* **68**: 17-26.
- Segel, I. H. (1993). *Enzyme kinetics*. Wiley & Sons, New York.
- Slavik, J. (1982). Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta* **694**: 1-25.
- Steinmetz, C.G., Xie, P., Weiner, H. y Hurley, T. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: The genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**: 701-711.
- Tenorio, V.M. (1995). Calidad de proteína en diferentes tipos de grano de amaranto (*Amaranthus spp.*). Tesis de Licenciatura, FES Iztacala, UNAM, México.



X. Referencias bibliográficas

- Tiwari, J.K. y Sikdar, S.K. (1999). Temperature-dependent conformational changes in a voltage-gated potassium channel. *Eur. Biophys. J.* **28**: 338-345.
- Valenzuela-Soto, E.M y Muñoz-Clares, R.A. (1993). Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an iso ordered bi bi steady state mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**: 23818-23823, and Additions and Corrections, *J. Biol. Chem.* **269**: 4692
- Valenzuela-Soto, E. y Muñoz-Clares, R.A. (1994). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* **143**: 145-152.
- Velasco-García, R., González-Segura, L. y Muñoz-Clares, R.A. (2000). Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **352**: 675-383.
- Velasco-García, R., Chacón-Aguilar, V.M., Hervet-Hernández D. y Muñoz-Clares, R.A. (2003). Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**: 149-158
- Vojtechová, M., Hanson, A.D. y Muñoz-Clares, R.A. (1997a). Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to methylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**: 81-88
- Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R., Valenzuela-Soto, E.M. y Muñoz-Clares, R.A. (1997b). Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biochim. Biophys. Acta* **1341**: 49-57.
- Weiner, H., Farrès, J., Rout, U.J., Wang, X. y Zheng, Ch.F. (1995). Site directed mutagenesis to probe for active site components of liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. En: Weiner, H. *et al.*, (eds.) *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 5*. Plenum Press, New York. pp. 1-7.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, V.P. y Hancock, R. (1981). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **118**: 197-203.
- Yaffe, M.B., Farr, G.W., y Sternlicht, H. (1989). Kinetics of beta-tubulin exchange following translation, evidence for a slow conformational change in beta-tubulin necessary for incorporation into heterodimers, *J. Biol. Chem.* **264**: 19045-19051.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. y Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1217.

TESIS CON
SELLA DE ORIGEN

XI. PERSPECTIVAS

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

EH-A

XI. Perspectivas

1. Es de gran importancia que se caracterice cinéticamente a la enzima parcialmente activa que se produce tras la incubación con sus ligandos. Para que de esta forma se pueda llegar a dilucidar el mecanismo de regulación de esta enzima.
2. Así mismo sugerimos que se indague más acerca del papel que tienen las cisteínas en el proceso de regulación-inactivación de la enzima por sus ligandos. Tomando en cuenta la cantidad de cisteínas tan exuberante que tiene esta enzima, raro de proteínas intracelulares.
3. Seguir los cambios conformacionales de la enzima inducidos por sus ligandos mediante otro tipo de experimentos como la calorimetría.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN