



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Obtención y caracterización funcional y estructural de la mutante
G125K de la enzima betaína aldehído deshidrogenasa de
Pseudomonas aeruginosa

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C A

P R E S E N T A:

Alicia Sánchez Izquierdo



MÉXICO, D. F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Miguel Antonio Costas Basin
VOCAL: Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares
SECRETARIO: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
PRIMER SUPLENTE: Dra. Lilian González Segura
SEGUNDO SUPLENTE: Dr. Ismael Bustos Jaimes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 102, Edificio E
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema: Dra. Rosario A. Muñoz Clares _____

Supervisor técnico: Biol. Carlos Mujica Jiménez _____

Sustentante: Alicia Sánchez Izquierdo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CONACYT, número de referencia 59654 y al SNI por la beca otorgada.

Al Dr. Miguel Costas Basin por el tiempo que invirtió en la revisión de esta tesis y por ofrecerme su ayuda de forma tan amable.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por su gran ayuda en la obtención del modelo de la mutante PaBADH G125K, gracias por siempre haber estado disponible, por sus ideas y por revisar con tanto cuidado mi tesis.

A mi asesora, la Dra Rosario gracias por permitirme ser parte de su laboratorio el cual considero el mejor lugar donde pude desarrollar mi tesis de licenciatura, y ahora mi posgrado. Gracias por ser un ejemplo del entusiasmo, el rigor, la disciplina y la pasión con la que se debe hacer ciencia, porque siempre tiene muchas hipótesis y experimentos que pueden probarlas. Porque siempre ve más allá de un experimento y porque siempre tiene en mente que la ausencia de evidencia no es evidencia de la ausencia. Por ocuparse de que mis compañeros y yo aprendamos a expresarnos de forma correcta, y porque seamos capaces de analizar las cosas por nosotros mismos. Muchas gracias doctora, gracias por todo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Ángel, Carlos, Fátima, Javier, Lilian, Mina, Rodrigo y Victor por su contribución invaluable al desarrollo de mi tesis y a mi crecimiento personal. Gracias porque siempre que les pido ayuda se dan el tiempo de contestarme, porque me enseñan cosas nuevas, porque me han escuchado y por las ideas y los consejos que me han brindado en algún momento. Ha sido un placer conocerlos y convivir con ustedes.

A mis padres Raquel y Eugenio, por ser los padres amorosos que son, gracias por haber hecho suyos mis sueños, por apoyarme siempre, porque siempre están conmigo, porque su amor no tiene límites.

A Raquel por ser la más chistosa de las hermanas y la mejor de las confidentes.

A toda mi familia y a todos mis amigos porque cada uno de ustedes ha cambiado mi vida, por todo lo que me han ayudado y porque siempre he podido contar con ustedes.

Gracias a mi querida Andrea, gracias por estar siempre conmigo, por hacerme tan feliz, por hacerme

libre, por sorprenderme tanto. Gracias por haber llenado toda mi vida de felicidad, por ser la mejor
Viernes cuenta cuentos, gracias por tomar mi mano y hacerme sentir querida.

A la vida... ¡Salud!

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	7
I. RESUMEN	8
II. ANTECEDENTES	10
II.1 Aldehído deshidrogenasas	10
II.1.1 Reacción catalizada y funciones fisiológicas	10
II.1.2 Mecanismo de reacción de las ALDHs	11
II.1.3 Clasificación de las ALDHs	12
II.1.4 Estructura de las ALDHs	13
II.2 Betaína aldehído deshidrogenasa	15
II.2.1 Localización intracelular	16
II.2.2 Relaciones filogenéticas	16
II.2.3 Especificidad y función biológica	17
II.2.4 Estructura tridimensional	18
II.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
II.3.1 Catabolismo de colina en <i>P. aeruginosa</i>	20
II.3.2 Catabolismo de glicina betaína en <i>P. aeruginosa</i>	21
II.3.3 Respuesta al estrés osmótico en <i>P. aeruginosa</i>	22
II.3.4 Relevancia de la BADH en <i>P. aeruginosa</i>	23
II.4 Betaína aldehído deshidrogenasas de <i>P. aeruginosa</i> (PaBADH)	23
II.4.1 Papel de cationes monovalentes en la estructura y función de la PaBADH	24
II.4.2 Utilización de la coenzima	25
II.4.3 Mecanismo cinético	25
II.4.4 Estructura tridimensional	26
II.4.5 Estabilidad	26
II.5. Antecedentes directos y planteamiento del problema	26
III. HIPÓTESIS	29
IV. OBJETIVOS	29
IV.1 Objetivo general	29
IV.2 Objetivos particulares	29
V. MATERIALES	31

V.1 Equipos	31
V.2 Reactivos	31
VI. MÉTODOS	32
VI.1 Modelaje estructural de proteínas	32
VI.2 Obtención de la mutante PaBADH G125K	33
VI.2.1 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la mutagénesis sito-dirigida	33
VI.2.2 Purificación del plásmido pCAL-betB	33
VI.2.3 Mutagénesis sitio-dirigida y amplificación por PCR.....	33
VI.2.4 Transformación de células de <i>E. coli</i> y sobreexpresión de la PaBADH G125K	34
VI.2.5 Obtención de extractos libres de células	34
VI.2.6 Medida de la actividad enzimática	35
VI.2.7 Purificación de la PaBADH G125K	35
VI.3 Electroforesis	36
VI.3.1 En geles de agarosa	36
VI.3.2 Desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	37
VI.4 Determinación de la unión del NAD(P)⁺	37
VI.5 Caracterización estructural de la PaBADH	38
VI.5.1 Cromatografía de exclusión molecular.....	38
VI.5.2 Fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos y extrínseca del ANS	39
VI.5.3 Dicroísmo circular	39
VI.6 Análisis de la estabilidad de la PaBADH frente a la desnaturalización con urea	39
VI.6.1 Preparación de disoluciones concentradas de urea	39
VI.6.2 Incubaciones de la PaBADH con urea	40
VI.7 Análisis de la estabilidad de la PaBADH frente a la desnaturalización térmica	41
VII. RESULTADOS	42
VII.1 Mutación <i>in silico</i> de la G125 por lisina	42
VII.2 Obtención de la PaBADH G125K	45
VII.2.1 Secuenciación del ADN mutado	46
VII.2.2 Sobreexpresión y purificación de la mutante G125K	47
VII.3 Determinación de la unión del NAD(P)⁺ de la PaBADH G125K	50

VII.4 Caracterización estructural de la PaBADH G125K	52
VII.4.1 Estructura cuaternaria	53
VII.4.2 Estructura terciaria	53
VII.4.3 Estructura secundaria	55
VII.5 Estabilidad de la PaBADH G125K	56
VII.5.1 Frente a la urea	56
VII.5.2 Frente a la temperatura	60
VIII. DISCUSIÓN	62
IX. CONCLUSIONES	67
X. PERSPECTIVAS	68
XI. BIBLIOGRAFÍA	70

ABREVIATURAS

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
AMBER	Assisted Model Building and Energy Refinement
ANS	8-anilino-1-naftaleno sulfonato
BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
C_m	Concentración de urea necesaria para tener el 50 % de enzima desnaturalizada
CEM	Centro espectral de masas
DC	Dicroísmo circular
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético (sal disódica)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia (por sus siglas en inglés)
IPTG	β -D-isopropiltiogalactósido
LB	Luria-Bertani
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
NADP ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato (forma reducida)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PaBADH	Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
SpBADH	Betaina aldehído deshidrogenasa de espinaca
TAE	Tris-acético-EDTA
T_m	Temperatura a la cuál se tiene el 50 % de la muestra desnaturalizada

I. RESUMEN

La betaína aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa* (PaBADH E.C. 1.2.1.8) cataliza la oxidación irreversible de betaína aldehído a glicina betaína con la concomitante reducción de NAD(P)⁺. En su estado nativo y activo, las enzimas de proteobacterias, hongos y animales son tetraméricas (en realidad, dímero de dímeros), mientras que las de plantas, firmicutes y actinobacterias son diméricas. Las implicaciones que estas diferencias en el estado de oligomerización tengan en la función y/o estabilidad de las BADHs todavía no se conocen. En un estudio filogenético de las BADHs se encontró que el residuo equivalente a G125 en la PABADH constituye una sinapomorfía de las BADHs tetraméricas. Dado que este residuo está situado en el área de contacto entre los dímeros y que las BADHs diméricas poseen en esta posición otros aminoácidos con cadenas laterales más voluminosas, se pensó que esta glicina pudiera estar relacionada con las diferencias en el estado de oligomerización de las BADHs.

En este trabajo se reporta la obtención de la mutante PaBADH G125K, como proteína recombinante en células de *Escherichia coli*, su purificación, su caracterización funcional y estructural, así como el análisis de su estabilidad frente a la urea y a la temperatura como agentes desnaturizantes. La enzima mutante no posee actividad y une muy pobremente al NAD(P)⁺. Además, esta unión presenta cooperatividad positiva con un n_H de 1.6 ± 0.3 , a diferencia de la enzima silvestre que tiene n_H de 1. Puesto que esta enzima mutante no presenta actividad BADH aun cuando sí es capaz de unir a los nucleótidos, la unión de éstos parece no llevarse a cabo de forma adecuada para permitir que ocurra la transferencia del hidruro desde el sustrato a la coenzima. A pesar de que la glicina en la posición 125 es una sinapomorfía en todas las BADHs tetraméricas, la mutación de este residuo por uno más voluminoso como la lisina no impide la tetramerización, ni afecta de manera considerable la estructura de la enzima a nivel terciario y secundario. Sin embargo, la mutante G125K mostró una menor estabilidad ante la desnaturización con urea, que tanto en la mutante como en la enzima silvestre parece ser un proceso de dos estados. Además, en la mutante el equilibrio de desnaturización se alcanza prácticamente al agregar la urea, por lo que este proceso está cinéticamente más favorecido que en el caso de la enzima silvestre. La mutante también es menos estable frente a altas temperaturas. En la desnaturización con temperatura, las dos enzimas presentaron dos transiciones, la segunda de las cuales probablemente corresponde a la precipitación de la enzima debido a la formación de agregados insolubles, los que claramente se observan al término del calentamiento. Los resultados obtenidos nos

permiten concluir que la mutación de este residuo involucrado en las interacciones de las intercaras dímero-dímero, que está situado lejos del sitio activo o del sitio de unión a los nucleótidos, afecta seriamente la estructura del sitio activo.

II ANTECEDENTES

II.1 Las aldehído deshidrogenasas

II.1.1 Reacción catalizada y funciones fisiológicas

Los aldehídos son moléculas electrofílicas altamente reactivas que reaccionan fácilmente con tioles y grupos amino. Son intermediarios en una gran cantidad de rutas bioquímicas metabólicas fundamentales ya que se generan durante el metabolismo de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, vitaminas y esteroides (Vasiliou y Nebert, 2005). También se generan en las perturbaciones del metabolismo que se producen a consecuencia de estreses ambientales como salinidad, deshidratación, frío o calor (Bartels, 2001). Los efectos que los aldehídos producen en el organismo son muy variados, pudiendo ser fisiológicos, terapéuticos, citotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos (Vasiliou y Nebert, 2005).

Un paso clave en la degradación de los aldehídos es su oxidación a ácidos carboxílicos, una reacción catalizada por las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs, EC 1.2.1). Estas enzimas utilizan al NAD^+ o NADP^+ como cofactor (Fig. 1).



Figura 1. Reacción general catalizada por las aldehído deshidrogenasas.

Las ALDHs pueden utilizar una gran variedad de sustratos, tales como aldehídos alifáticos (lineales y ramificados) o aromáticos, o bien aldehídos funcionalizados en la posición α al carbonilo como el malondialdehído. Pueden usar NAD^+ o NADP^+ como coenzimas, pero la mayor parte de las caracterizadas hasta el momento prefieren usar NAD^+ (Yoshida *et al.*, 1998).

Las ALDHs están presentes en todos los organismos a lo largo de toda la escala filogenética, lo que muestra su gran relevancia fisiológica. En un principio se pensó que la única función de estas enzimas era de desintoxicación, al oxidar a aldehídos tóxicos de origen endógeno o exógeno al ácido correspondiente no tóxico. Sin embargo, se sabe hoy en día que participan en otras funciones, como,

por ejemplo, en la respuesta a un estrés osmótico, que es el caso de las BADHs. Algunas ALDHs sin actividad enzimática juegan un importante papel de protección en la córnea y el cristalino (Vasiliou y Nebert, 2005).

II.1.2 Mecanismo de reacción de las ALDHs

El mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas consiste en una catálisis covalente y ácido-básica que consta de los siguientes pasos (Fig. 2):

1) *Acilación*: El tiolato de la cisteína catalítica realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del carbonilo para formar un intermediario hemitioacetal tetraédrico (1). El oxianión formado en este paso es estabilizado mediante dos puentes de hidrógeno que recibe de la asparragina catalítica y del NH de la cadena principal de la cisteína catalítica.

2) *Transferencia del hidruro*: Cuando el par de electrones del hemitioacetal desprotonado regresa al carbono aldehídico se regenera la hibridación sp^2 y se propicia la transferencia del hidruro del aldehído al nucleótido (NAD^+ o $NADP^+$) para formar el intermediario tioéster y el nucleótido reducido.

3) *Desacilación*: La hidrólisis del tioéster por un ión hidroxilo, resultante de la activación de una molécula de agua por el glutámico catalítico, libera el grupo tiol y el producto ácido de la reacción.

4) *Liberación de los productos*: Por último, se liberan los productos en forma ordenada, primero el ácido y después el nucleótido reducido, regenerándose la enzima libre.

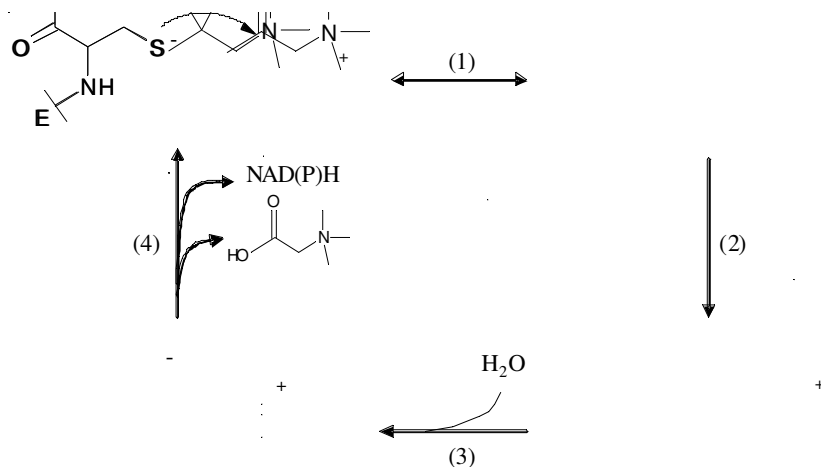


Figura 2. Esquema del mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs.

II.1.3 Clasificación de las ALDHs

Con el paso de los años han sido clasificadas de distintas maneras, ya sea por la naturaleza de la molécula que genera el nucleófilo (A^-) que ataca al intermediario tioéster de la reacción que catalizan (Fig. 2), o por su localización subcelular, en el caso de las enzimas de mamíferos (Jakoby, 1963; Lindhal y Hempel, 1991). Atendiendo al primer criterio, la enzima se clasifica como de clase I si A^- es un ión hidroxilo, de clase II si A^- es un fosfato, arsenato o tiolato y de clase III cuando la ruptura del enlace tioéster resulta de la combinación de las dos clases anteriores (Jakoby, 1963). Basándose en su localización celular, las ALDHs citosólicas de animales se clasifican como de clase I, las mitocondriales de clase II, y las microsomales de clase III (Lindhal y Hempel, 1991). Todas estas son de clase I de acuerdo al primer criterio. Hoy en día se sabe que forman parte de la superfamilia de las ALDHs sólo aquellas enzimas que en su mecanismo químico tienen un paso de hidrólisis del tioéster, o de tiolisis que resulta en la transferencia del hidruro a la coenzima A (Vasiliou *et al.*, 1999).

Las ALDHs se han clasificado por la Enzyme Commission (E.C.) en base a su especificidad por el sustrato aldehído, lo que indica su papel fisiológico. Sin embargo esta clasificación en ocasiones no es precisa, porque a una misma enzima se le han asignado diferentes números E.C. dependiendo del sustrato con el que se haya medido su actividad. Tal es el caso de las BADHs de animales que pueden usar como sustratos, además de la betaína aldehído, a diferentes aminoaldehidos y por ello se las han clasificado como la isoenzima E3 aldehído deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.5), la 4-N-trimetil aminobutialdehído deshidrogenasa (E.C. 1.2.1.47) y la aminobutiraldehído deshidrogenasa (E.C.1.2.1.19) (Julián-Sánchez *et al.*, 2007). El gran número de ALDHs cuya secuencia de aminoácidos ya se conoce, junto con las herramientas que hoy existen de comparación y análisis de secuencias, han permitido clasificarlas de acuerdo a sus relaciones filogenéticas en más de 20 familias que en conjunto forman la superfamilia de las ALDHs (Sophos y Vasiliou, 2003).

II.1.4 Estructura de las ALDHs

En 1949 se publicó por primera vez la actividad y purificación de una ALDH a partir del hígado de bovino (Racker, 1949). En 1967 se logró la purificación a homogeneidad de una ALDH de *Sacharomyces cerevisiae* (Steinman y Jakoby, 1967), pero no fue sino hasta 1984 que se concluyó la

primera secuenciación de una ALDH clase 1; la de hígado de humano (Hempel *et al.*, 1984). En 1997 se publicaron las primeras estructuras tridimensionales de ALDHs: la de la enzima tetramérica de clase 2 (ALDH2) bovina (Steinmetz *et al.*, 1997) y la de la enzima dimérica de clase 3 (ALDH3) de rata (Liu *et al.*, 1997). Hasta la fecha se han determinado 23 estructuras tridimensionales de diferentes ALDHs. En todas éstas se encontró un plegamiento similar, sin importar su estado de oligomerización (Fig. 3). Poseen tres dominios en cada subunidad: un dominio de unión a la coenzima en la región N-terminal, un dominio catalítico y un dominio de oligomerización, mediante el cual se forma la unidad dimérica. Este último dominio es una extensión del dominio de unión a la coenzima y de ahí la importancia del NAD(P)⁺ en el mantenimiento de la estructura cuaternaria encontrada por Velasco-García *et al.* (1999). Los dos primeros dominios presentan un plegamiento tipo Rossmann (Rossman *et al.*, 1974).

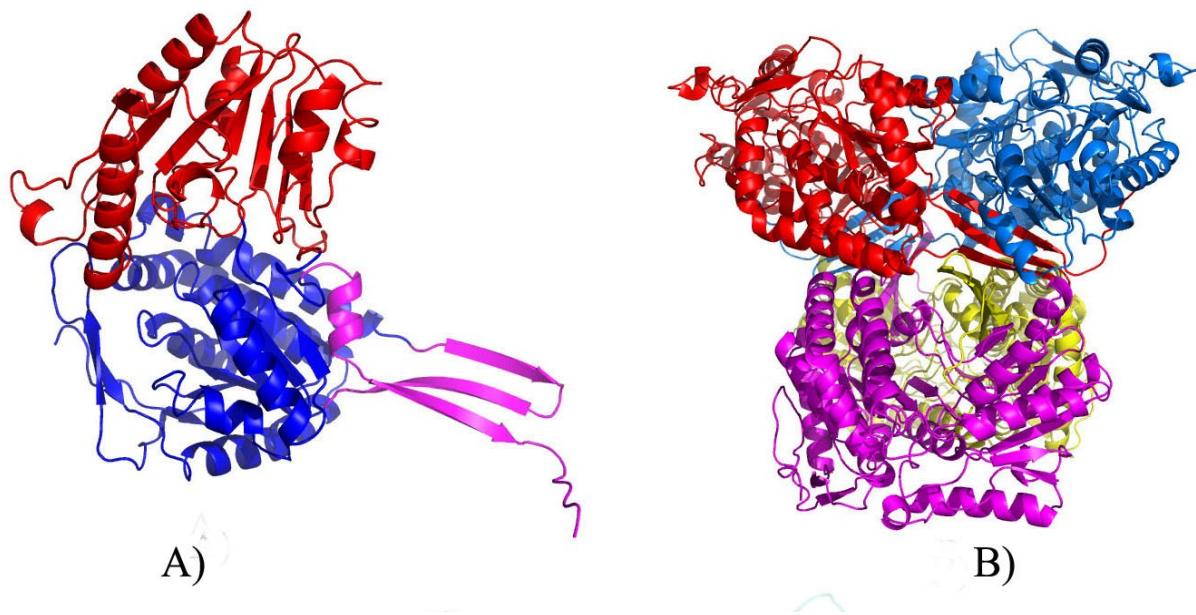


Figura 3. Estructura tridimensional de la betaína aldehído deshidrogenasa (PaBADH, código PDB 2wme) como ejemplo de una ALDH (A) Monómero coloreado según sus dominios: en rojo, el dominio de unión a la coenzima; en azul, el dominio catalítico y en magenta, el dominio de oligomerización. (B) Tetrámero de la PaBADH; en rojo se muestra la subunidad A, en azul la subunidad B, en magenta la subunidad C y en amarillo se muestra la subunidad D.

Hasta la fecha no se conocen bien las razones por las cuales unas ALDHs son diméricas y otras tetraméricas. Rodríguez-Zavala y Weiner (2002) analizaron las posibles causas de la diferencia en el estado de oligomerización de la ALDH1 (tetramérica) y el de la ALDH3 (dimérica). La ALDH3 posee una extensión en la región carboxilo terminal de 17 residuos que se propuso como la responsable de impedir la tetramerización (Fig. 4). Sin embargo, con las mutantes de la ALDH1 con esta región

adicionada y las mutantes de la ALDH3 con la región eliminada, no se obtuvieron cambios en el estado de oligomerización de las enzimas. Por otra parte en un alineamiento múltiple de secuencias de ALDHs se encontró que la superficie hidrofóbica de la intercara de las enzimas tetraméricas es mayor de la que existe en las enzimas diméricas, por lo que se sugirió que es ésta la fuerza más importante que mantiene a la estructura cuaternaria (Rodríguez-Zavala y Weiner, 2002).

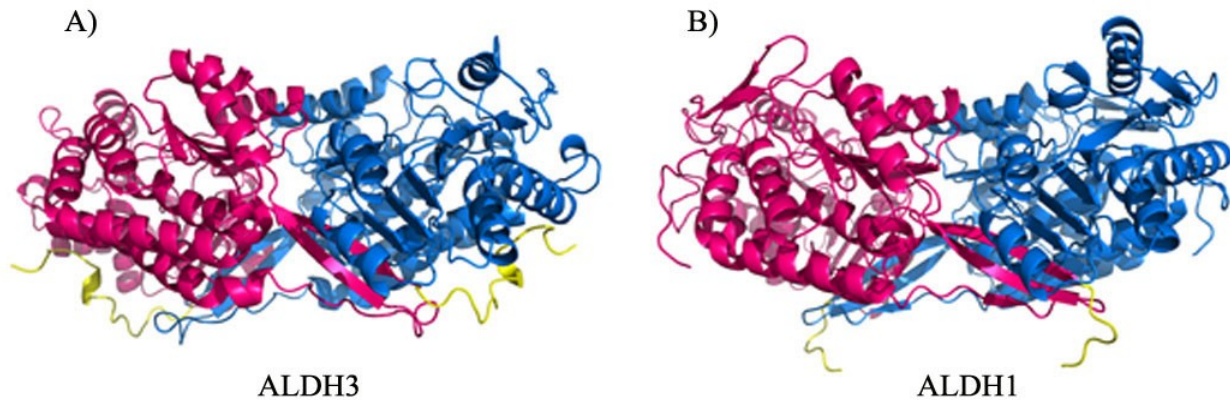


Figura 4. (A) Dímero de la ALDH3 (código PDB 1ag8). (B) Dímero de la ALDH1 (código PDB 1ad3). Representación en listones, mostrando en rojo y azul las dos subunidades del dímero y en amarillo la región carboxilo terminal. En el caso de la ALDH1 la región carboxilo terminal forma parte de la intercara dímero-dímero, mientras que en la ALDH3 esta región, que se extiende 17 residuos a partir del extremo de la ALDH1, está expuesta al solvente.

II.2 Betaína aldehído deshidrogenasas

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, betaína aldehído NAD(P)⁺ oxidoreductasa, E.C. 1.2.1.8) pertenece a la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas y cataliza la oxidación irreversible de la betaína aldehído con la simultánea reducción del NAD(P)⁺ (Rothschild y Guzman-Barron, 1954) de acuerdo a la siguiente reacción (Fig. 5):



Figura 5. Reacción catalizada por la BADH.

Se han podido purificar BADHs de distintos organismos, ya sea eucarióticos o procarióticos, como la de *P. aeruginosa* (Nawasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 1999), de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990), de *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992), de *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1997), de *Arthrobacter globiformis* (Mori *et al.*, 2002), del hongo *Cylindrocarpon didymum* (Mori *et al.*, 1980), de la hoja de espinaca (Arakawa *et al.*, 1987; Weretilnyk y Hanson, 1989), de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), de plántulas de avena (Livingstone *et al.*, 2003), del corazón de cangrejo (Dragolovich y Pierce, 1994), del riñón de cerdo (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998), del hígado de rata (Pietruszko y Chern, 2001), del hígado de bacalao (Hjelmqvist *et al.*, 2003) y del hígado de humano (Chern y Pietruszko, 1995).

La BADH de algunos organismos se ha logrado expresar como proteína recombinante en células de *E. coli* transformadas con un vector de expresión conteniendo el gen correspondiente. Concretamente se han obtenido de esta forma las enzimas de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1997), la de espinaca (Incharoensakdi *et al.*, 2000), de *Avicennia marina* (Hibino *et al.*, 2001), de *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 2006a), de *Zoysia tenuifolia* (Oishi y Ebina, 2005) y de cebada (Fujiwara *et al.*, 2008).

Las BADHs tienen localizaciones sub-celulares, especificidades a sustratos, funciones fisiológicas, propiedades estructurales y propiedades cinéticas diferentes. Existen revisiones recientes sobre esta enzima (Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto, 2008; Fitzgerald *et al.*, 2009; Muñoz-Clares *et al.*, 2009) que tratan diferentes aspectos. A continuación se describen aquellos más relevantes para este trabajo.

II.2.1 Localización intracelular

En animales la actividad BADH se encuentra principalmente en el citosol (Rothschild y Guzman-Barron, 1954; Ambroziak y Pietruszko, 1991) y en menor proporción en la mitocondria, (Pietruszko y Chern, 2001), mientras que en plantas esta actividad se localiza en el estroma del cloroplasto o en peroxisomas, con una pequeña cantidad de actividad en el citosol (Weigel *et al.*, 1986; Nakamura *et al.*, 1997; Nakamura *et al.*, 2001; Shirasawa *et al.*, 2006). Hasta el momento todas las BADHs purificadas son solubles y no se ha encontrado ninguna proteína asociada a membranas.

II.2.2 Relaciones filogenéticas

Proteínas con actividad de BADH y secuencias ortólogas se han encontrado ampliamente distribuidas, pero hasta la fecha no se ha encontrado secuencias BADH ni en cianobacterias ni en arqueas.

En un reciente estudio en el que se hizo un alineamiento de todas las secuencias depositadas en los bancos de datos hasta esa fecha, se encontró que las BADHs se agrupan en tres familias: ALDH9 formada por proteínas de proteobacterias, hongos y animales; ALDH10 formada por proteínas de plantas y algunas de hongos y bacterias, y una tercera familia (nombrada como ALDH25) que está formada por proteínas de firmicutes y actinobacterias. Los miembros de cada una de estas familias poseen el mismo estado de oligomerización: aquellas BADHs de la familia ALDH9 son tetraméricas, mientras que las de la familia ALDH10 y ALDH22 son diméricas (Julián-Sánchez *et al.*, 2007). En las secuencias codificantes para BADHs, se ha encontrado que los residuos de los aminoácidos implicados en la actividad catalítica, la unión de la coenzima y la región de unión al sustrato están altamente conservados en las especies examinadas.

II.2.3 Especificidad y función biológica

Además de betaína aldehído, algunas BADHs pueden usar otros aldehídos como sustrato. Tal es el caso del 3-dimetil-sulfonio-propionaldehído (Vojtechova *et al.*, 1997), el γ -amino-butiraldehído (Kuris *et al.*, 1989), el 4-N-trimetil-amino-butiraldehído (Chern y Pietruszko, 1995) y el 3-amino-propionaldehído (Vojtechova *et al.*, 1997; Trosat *et al.*, 1997). En lo que respecta a la coenzima, se ha encontrado que la gran mayoría de las BADHs estudiadas muestra preferencia por el NAD⁺, con la excepción de las enzimas de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 2000), *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992) y *A. globiformis* (Mori *et al.*, 2002) que pueden usar NAD⁺ o NADP⁺ casi indistintamente.

El hecho de que las BADHs pueden usar una amplia variedad de sustratos sugiere que están involucradas en distintas funciones biológicas. En animales, la BADH participa en la síntesis de glicina betaína, que sirve como osmoprotector de células de riñón (Grunewald y Eckstein, 1995) así como de donador de metilos en la biosíntesis de metionina (Muntz, 1950). Además participa en el catabolismo de poliaminas (Ambroziak y Pietruszko, 1991), en la producción del ácido γ -amino-butírico en las glándulas suprarrenales (Chern y Pietruszko, 1995) y en la síntesis de carnitina (Vaz *et al.*, 2000).

En plantas, las BADHs de cloroplasto están involucradas en la síntesis de glicina betaína (Rhodes y Hanson, 1993) y de dimetilsulfonio-propionato (Vojtechová *et al.*, 1997; Trossat *et al.*, 1997), que son eficientes osmoprotectores. Por ello, estas enzimas se involucran en la respuesta al estrés

osmótico provocado por sequía, suelos hipersalinos o frío. Las BADHs peroxisomales pudieran participar en el catabolismo de poliaminas.

En bacterias, las BADHs están implicadas en la síntesis de glicina betaína, como parte de la respuesta de estos organismos al estrés osmótico (Falkenberg y Strom, 1990; Boch *et al.*, 1997), o como parte del catabolismo de colina (Nagasawa *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1988; Meskys *et al.*, 2001; Velasco-García *et al.*, 2006; Wargo *et al.*, 2008) en aquellas bacterias capaces de crecer en colina como su única fuente de carbono, nitrógeno y energía. Es interesante que estas bacterias poseen una BADH anfibólica, es decir, que usa indistintamente NAD^+ o NADP^+ y así provee de equivalentes de reducción tanto para obtención de energía (NADH) como para biosíntesis (NADPH). En otros microorganismos están involucradas en el metabolismo de aminoaldehídos (Julián-Sánchez *et al.*, 2007).

Por lo anteriormente expuesto, queda claro que la función fisiológica que juegan las BADHs depende del organismo y/o el tejido en que se encuentren, de su localización intracelular y de su especificidad tanto por el aldehído como por la coenzima. Para conocer inequívocamente el papel fisiológico de las BADHs de microorganismos se ha estudiado el contexto genómico de los genes de BADH (Julián-Sánchez *et al.*, 2007). Pero será necesario hacer caracterizaciones fenotípicas con los apropiados organismos *knock-out*, y en el caso de aquellas que sean inducibles conocer los compuestos o condiciones que inducen su expresión, para comprender mejor su función fisiológica.

II.2.4 Estructura tridimensional

Todas las BADHs caracterizadas hasta la fecha son tetraméricas o diméricas. Sólo se conoce la estructura tridimensional de tres BADHs tetraméricas; la de hígado de bacalao, tanto en su forma apo como en complejo con NAD^+ (Johansson *et al.*, 1998, códigos PDB 1a4s y 1bpw, respectivamente), la de *P. aeruginosa* en complejo con NADP^+ (González-Segura *et al.*, 2009, código PDB 2wme) y con NADPH (Díaz-Sánchez *et al.*, sometido; código PDB 2wox) y la de *Staphylococcus aureus* en su forma apo y en complejo con NAD^+ (códigos PDB 3ed6 y 3fg0 respectivamente). Cada subunidad posee el mismo plegamiento que el resto de las ALDHs de estructura tridimensional conocida, y el arreglo de estructura cuaternaria es asimismo similar al conocido en otras ALDHs tetraméricas.

II.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, ubicua, aerobia constitutiva y anaerobia

facultativa, que es capaz de crecer en una gran variedad de ambientes y condiciones: suelos, pantanos, ambientes marinos y, como patógena, en diversos tejidos de plantas y animales (Hardalo y Edberg, 1997). Su movilidad en medio líquido se debe a un único flagelo polar (Macnab, 1996). Es un patógeno oportunista de humanos que ataca a sujetos inmunocomprometidos, como enfermos de Sida o de cáncer que están siendo tratados por quimioterapia (Bergen y Shelhamer, 1996) y que presenta resistencia a la acción de la mayoría de los antibióticos de uso común y a desinfectantes. Es la principal causa de muerte en enfermos con fibrosis quística (Pier, 1985; George, 1987; Govan y Deretic, 1996), causa neumonía en pacientes que han recibido respiración artificial y puede causar bacteriemia en sujetos con quemaduras graves (Madigan *et al.*, 1997).

En el año 2000 se completó la secuenciación del genoma de la cepa PAO1. Esta cepa fue aislada de la herida de un paciente (Holloway, 1955) y es la generalmente usada en investigación. El tamaño del genoma es de 6.3 millones de pares de bases, arreglados en un único cromosoma circular. Contiene más familias de genes que el genoma de *E. coli*, ambos genomas presentan un arreglo transcripcional en operones parecido. El 32 % de los genes de la secuencia genómica de *P. aeruginosa* no tienen homología con las secuencias depositadas en los bancos de datos, por lo que presumiblemente se trata de genes que codifican para proteínas de función novedosa. También es de destacar que muchos de los genes de *P. aeruginosa* codifican para transportadores, lo que puede estar relacionado con su alta resistencia a antibióticos (Stover *et al.*, 2000).

P. aeruginosa es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, lo que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrientes que otros organismos pueden asimilar (Hardalo y Edberg, 1997). Utiliza preferentemente algunos intermediarios del ciclo de Krebs (por ejemplo el succinato) pero también metaboliza glucosa, aunque, a diferencia de otros organismos como *E. coli*, no la descompone por la vía Embden-Meyerhof sino a través de la ruta de Entner-Doudoroff (Lessie y Phibbs, 1984).

II.3.1 Catabolismo de colina en *P. aeruginosa*

En los sitios de infección de *P. aeruginosa* se encuentra abundantemente la colina y sus precursores (Pesin y Candia, 1982; Wright y Clements, 1987), sustancias que la bacteria es capaz de metabolizar como única fuente de carbono nitrógeno y energía oxidándolas hasta piruvato en una ruta

catabólica cuyo segundo paso está catalizado por la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) y que por tanto tiene a glicina betaína como intermediario (Fig. 6).

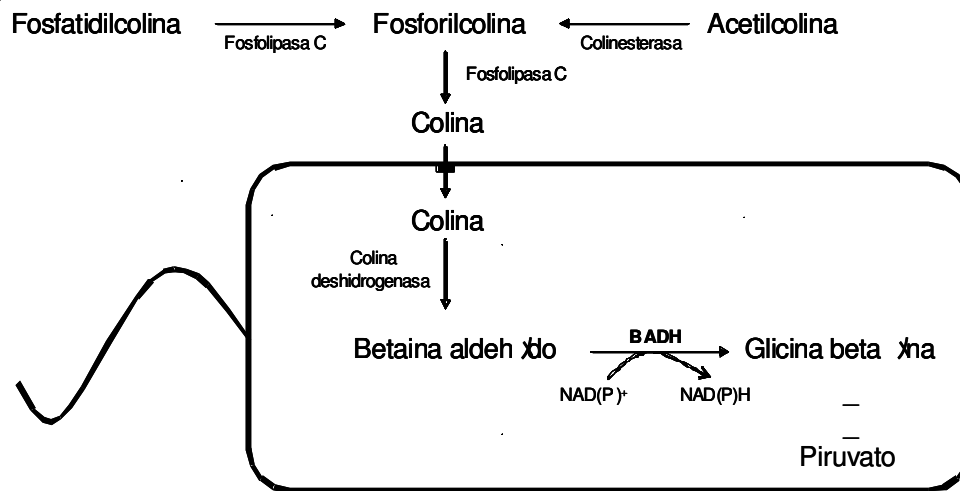


Figura 6. Catabolismo de colina y sus precursores en *P. aeruginosa*. BADH, betaína aldehído deshidrogenasa.

Cuando *P. aeruginosa* crece en presencia de colina se induce un transportador de ésta que es reprimido por succinato (Salvano *et al.*, 1989). Posee otro sistema transportador de colina que es constitutivo y no se reprime por succinato. Este último es probablemente el responsable de la toma inicial de colina cuando la bacteria se pone en presencia de colina (Lucchesi *et al.*, 1998).

En el genoma de *P. aeruginosa*, los genes que codifican para la colina deshidrogenasa, la BADH y el regulador transcripcional BetI forman un operón *betIBA* similar al operón *betIBA* descrito en *E. coli* (Lamark *et al.*, 1991). El gen del transportador inducible de colina (*betTI*) está cercano a este operón con una orientación divergente, al igual que su análogo en *E. coli*. Se piensa que en la región intergénica entre *betTI* y *betIBA* se encuentran dos promotores divergentes, uno para *betIBA* y otro para *betTI* (Velasco-García *et al.*, 2006a). A diferencia de lo que ocurre en *E. coli*, en el que la glicina betaína se usa sólo como un osmoprotector y no es metabolizada, en *P. aeruginosa* la expresión de la BADH no se induce cuando la bacteria crece en un medio con altas concentraciones de sal, sólo se induce por colina (Velasco-García *et al.*, 2006a).

II.3.2 Catabolismo de glicina betaína en *P. aeruginosa*

Actualmente se conoce el conjunto completo de genes involucrados en el catabolismo de glicina betaína

en *P. aeruginosa*. En 2006, Diab y colaboradores mostraron mediante un análisis proteómico que cuando *P. aeruginosa* crece en glicina betaína como única fuente de carbono, ésta induce la síntesis de la mayoría de las proteínas involucradas en su degradación. Pero si la bacteria crece en un medio hiperosmótico, la degradación de glicina betaína se reprime, sirviendo ésta como osmoprotector (Lucchesi *et al.*, 1995). También encontraron que la glicina betaína funciona como fuente de carbono y osmoprotector si la bacteria crece en un medio con glucosa. Sin embargo, si la bacteria crece en un medio con succinato, la glicina betaína actúa sólo como osmoprotector ya que el succinato reprime la síntesis de enzimas involucradas en el catabolismo de glicina betaína (Diab *et al.*, 2006).

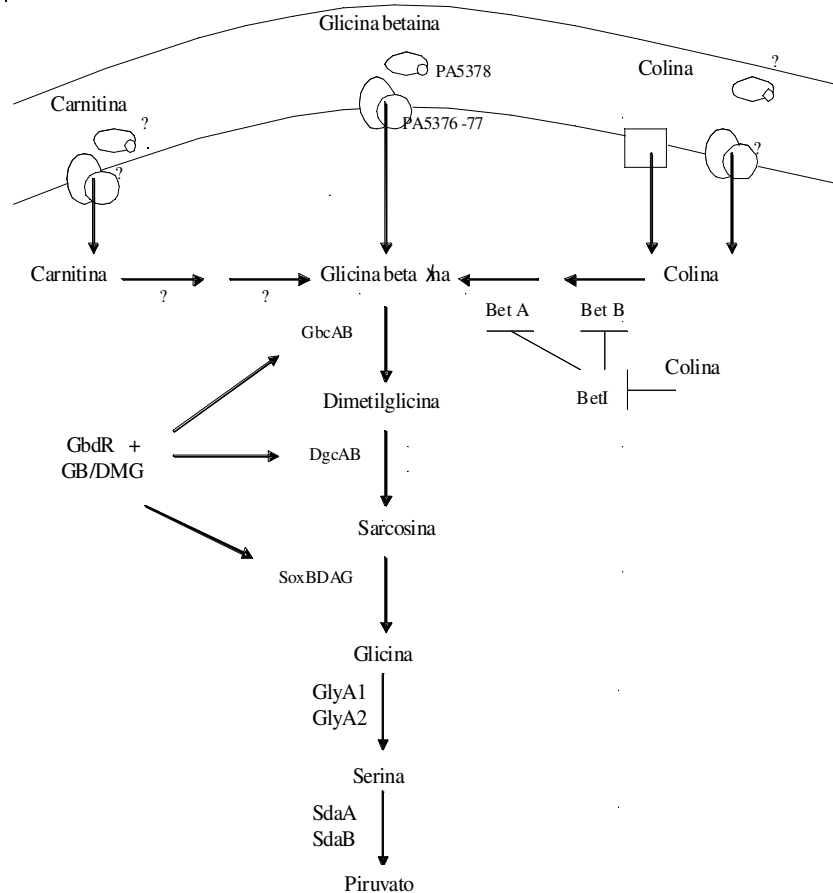


Figura 7. Rutas de síntesis y de degradación de glicina betaína en *P. aeruginosa*. Genes: *betA*, colina deshidrogenasa; *betB*, BADH; *betI* represor transcripcional del locus *betABI*, *gbcA* y *gbcB*, glicina betaína demetilasa; *dgcaB*, dimetilglicina demetilasa; *soxBDAG*, complejo sarcosina oxidasa; *glyA*, serina hidroximetiltransferasa; *sda* y *sdaB*, serina deshidratasa. Los signos de interrogación representan pasos que no han sido completamente demostrados en *P. aeruginosa*. Tomado de Wargo *et al.* (2008) y Diab *et al.* (2006).

II.3.3 Respuesta al estrés osmótico en *P. aeruginosa*

Una peculiaridad de *P. aeruginosa* es su capacidad de crecer en ambientes salinos porque es capaz de almacenar osmolitos producidos intracelularmente o captados del medio externo cuando está sometida a estrés osmótico. *P. aeruginosa* sintetiza y acumula N-acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN), trehalosa y ácido glutámico en ausencia de fuentes exógenas de osmoprotectores. No obstante, si en el medio extracelular están presentes osmolitos, o colina y sus precursores, *P. aeruginosa* acopia preferentemente glicina betaína. Esta acumulación hace que disminuyan los niveles de los tres osmolitos endógenos (D'souza-Ault *et al.*, 1993). Se ha reportado que 1 mM de glicina betaína en el medio de cultivo es capaz de aumentar la tolerancia al estrés osmótico en *P. aeruginosa* hasta concentraciones de 0.7 M de NaCl (D'souza-Ault *et al.*, 1993). Como ya se ha mencionado, *P. aeruginosa* es también capaz de sintetizar glicina betaína a partir de colina, una habilidad que comparte con otros muchos organismos. La glicina betaína juega por tanto un doble papel en *P. aeruginosa*: como osmoprotector y como intermediario del catabolismo de colina.

II.3.4 Relevancia de la BADH en *P. aeruginosa*

Gracias a la actividad de la BADH la bacteria no sólo puede obtener carbono, nitrógeno y energía a partir de compuestos muy abundantes en los sitios de infección, sino que además obtiene un muy eficiente osmoprotector, (glicina betaína), y equivalentes de reducción tanto para el anabolismo y defensa frente al estrés oxidativo que le imponen las defensas del hospedero (NADPH) como para la producción de energía (NADH). Por esto se cree que la BADH es una enzima clave en la virulencia de la bacteria y un posible blanco de agentes antimicrobianos. A este respecto es importante destacar que cepas de *P. aeruginosa* con el gen que codifica para la BADH mutado son incapaces de crecer en presencia de colina, aun cuando exista otra fuente de carbono en el medio de cultivo o se añada a éste glicina betaína. Ello debido al efecto tóxico de la betaína aldehído que se acumula en la mutante (Sage *et al.*, 1997). De aquí la importancia de conocer a fondo las características cinéticas y estructurales de esta enzima, para poder seleccionar o diseñar un inhibidor que pudiera llegar a usarse como fármaco en el combate de la infección.

II.4 Betaína aldehído deshidrogenasa de *P. aeruginosa* (PaBADH)

En *P. aeruginosa* la BADH (PaBADH) cataliza la oxidación irreversible de la betaína aldehído para

formar la especie glicina betaína, con la concomitante reducción de NAD^+ o NADP^+ (Fig. 5). Esta reacción constituye el segundo paso de la ruta de degradación de la colina cuando la bacteria crece en un medio con este compuesto o con sus precursores como única fuente de carbono, nitrógeno y energía.

En nuestro laboratorio se ha tratado esta enzima como posible blanco de fármacos. El objetivo de inhibir su actividad es no sólo detener la producción del osmoprotector glicina betaína o interrumpir el catabolismo de la colina, sino provocar la acumulación de la betaína aldehído. Esto conllevará la muerte de la bacteria, dado que la betaína aldehído es un compuesto altamente tóxico.

Dado que el primer paso del mecanismo químico de esta enzima, y en general de las ALDHs, es el ataque nucleofílico del grupo tiol del residuo de la cisteína catálitica sobre el carbono del carbonilo del aldehído, se han probado reactivos específicos para tioles como inhibidores de la actividad de la PaBADH (Velasco-García *et al.*, 2006b). Estos compuestos pudieran tener un uso en el combate de la infección por *P. aeruginosa* ya que son fármacos actualmente aprobados y usados en la clínica para otros fines. Sin embargo, para el desarrollo y optimización de inhibidores específicos es necesario ahondar en la caracterización fisicoquímica, mecanística y estructural de esta enzima.

La PaBADH fue aislada por primera vez en 1976, al inducir su síntesis creciendo a la bacteria en colina como única fuente de carbono (Nagasawa *et al.*, 1976). En 1999 se mejoró el protocolo de purificación, aumentando considerablemente el rendimiento (Velasco-García *et al.*, 1999). Actualmente la enzima está expresada en células BL21(DE3)-pLysS (Stratagene) de *E. coli* a través del vector de expresión pCAL-BetB, que contiene el gen que codifica para la PaBADH (Velasco-García *et al.*, 2006a).

El estudio constante que se ha hecho en el laboratorio sobre esta enzima ha permitido conocer muchos detalles sobre su comportamiento. A continuación se presentan algunos de los hallazgos relevantes de estos estudios.

II.4.1 Papel de cationes monovalentes en la estructura y función de la PABADH

La PaBADH posee dos sitios de unión a cationes monovalentes por subunidad (González-Segura *et al.*, 2009). Uno de ellos se localiza en una cavidad intrasubunidad que está presente en todas las estructuras cristalinas de las ALDHs conocidas. Se piensa que el papel que desempeña el K^+ unido a este sitio es el de contribuir a que la enzima adopte una conformación óptima para la unión del nucleótido. El otro sitio de unión a potasio, que no había sido reportado antes en ninguna ALDH (pero que parece estar presente en la mayoría de las enzimas cuya estructura tridimensional se conoce) se localiza entre los

monómeros de la unidad dimérica en una región involucrada en la unión de la coenzima, por lo que se piensa que juega un papel en la estabilización del dímero y también en la unión del nucleótido (Fig. 8).

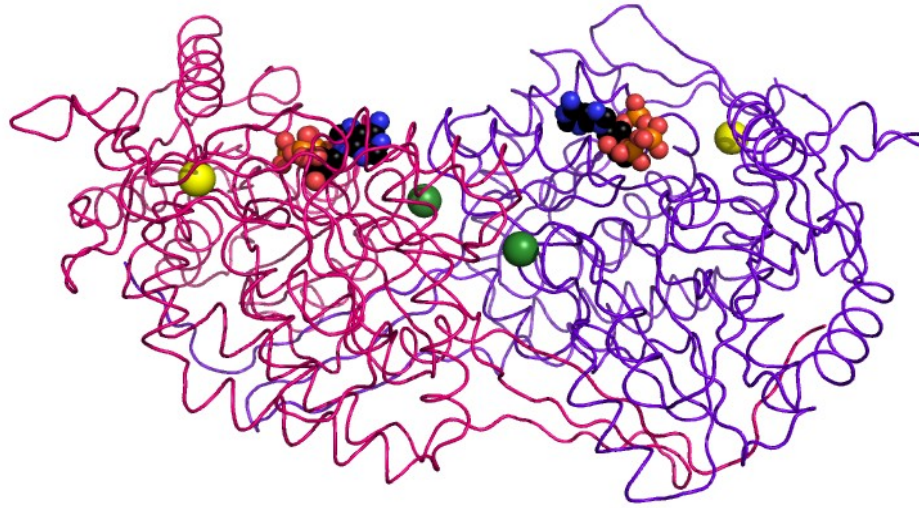


Figura 8. Unidad dimérica de la PaBADH código PDB 2wme. Los iones potasio intersubunidad se muestran como esferas verdes y los iones potasio intrasubunidad como esferas amarillas. También se muestra a la molécula de NADP⁺ unida al sitio activo, representada como esferas coloreadas por átomos.

II.4.2 Utilización de la coenzima

La PaBADH es capaz de utilizar tanto el NAD⁺ como el NADP⁺. Esta versatilidad en el uso de la coenzima refleja las diferencias en los roles metabólicos que juega la enzima. El papel anabólico involucra la síntesis de GB generando NADPH. Por otro lado, participa catabólicamente en la degradación de colina generando NADH. Así pues la PaBADH juega un papel anfibólico en el metabolismo.

II.4.3 Mecanismo cinético

Se trata de un mecanismo Bi Bi secuencial preferentemente ordenado en estado estacionario. Es decir, que la enzima libre une en primera instancia al nucleótido oxidado y el nucleótido reducido es el último producto en liberarse (Velasco-García *et al.*, 2000).

La PABADH presenta un mecanismo Iso. Este tipo de mecanismo se da cuando tiene lugar un paso de isomerización de la enzima libre después de la liberación del último producto NAD(P)H y antes de la unión del primer sustrato NAD(P)⁺. El NAD(P)H se comporta como un inhibidor no competitivo

mixto.

II.4.4 Estructura tridimensional

La PaBADH es un homotetrámero de 490 aminoácidos y una masa molecular de 53.3 kDa por subunidad (213 kDa como tetrámero). La cristalografía de rayos X (González-Segura *et al.*, 2009; Díaz-Sánchez *et al.*, sometido) mostró que su estructura tridimensional es semejante a la de todas las ALDHs cristalizadas hasta la fecha (Fig. 3).

II.4.5 Estabilidad

La presencia de una fuerza iónica fisiológica y de iones K^+ estabiliza el estado tetramérico nativo (Velasco-García *et al.*, 1999; Valenzuela-Soto *et al.*, 2003). En ausencia de iones K^+ , baja fuerza iónica en el medio y baja concentración de proteína, la PaBADH es básicamente monomérica (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003). Además se sabe que la mutación del residuo no esencial de cisteína C439, localizado en el dominio de oligomerización, se traduce en la desestabilización de la estructura nativa tetramérica, dando lugar a dímeros inactivos e inestables. (González-Segura *et al.*, 2005) y que la modificación de la PaBADH con disulfiram da lugar a la disociación en monómeros a temperatura ambiente y a la formación de agregados de alto peso molecular a 37 °C (Velasco-García *et al.*, 2006b).

Por medio de calorimetría diferencial de barrido y de dicroísmo circular se ha estudiado la estabilidad térmica de la PaBADH y cómo se afecta por la fuerza iónica y por la presencia de iones monovalentes, K^+ y Na^+ . Se encontró que la máxima estabilidad se da a fuerza iónica cercana a la fisiológica y en presencia de K^+ . La desnaturalización térmica a alta fuerza iónica es irreversible, formándose agregados visibles, mientras que a baja fuerza iónica la proteína forma agregados solubles que retienen el 80% de estructura secundaria (Garza-Ramos *et al.*, 2005).

II.5 Antecedentes directos y planteamiento del problema

En un estudio filogenético de las BADHs (Julian-Sánchez *et al.*, 2007) se encontró que todas las enzimas tetraméricas poseen en el dominio de oligomerización una glicina en la posición 174 del alineamiento, que corresponde a la 125 de la PaBADH, mientras que las enzimas diméricas poseen otro

aminoácido con cadena lateral más voluminosa, frecuentemente una lisina (Fig. 9).

Figura 9. Sinapomorfía de las ALDH9. En la figura se muestra el sitio 174 del alineamiento de las secuencias de las tres familias de BADHs, correspondiente al residuo glicina 125 de la PaBADH. La rama izquierda contiene las secuencias conocidas de las BADHs diméricas de plantas, firmicutes y actinobacterias. La rama derecha contiene a las secuencias de las BADHs tetraméricas de animales, proteobacterias y hongos. En la figura se muestra que el residuo de Gly está estrictamente conservado en estas últimas, por lo que se propuso como un residuo implicado en la diferencia de estado de oligomerización entre las familias de BADHs diméricas y tetraméricas. Tomado de (Julián-Sánchez *et al.*, 2007).

Puesto que en las estructuras tridimensionales de las BADHs tetraméricas conocidas la G125 se encuentra en la intercara entre dos subunidades de diferentes dímeros, (es decir, entre las intercaras A-C y B-D) (Fig. 10), mientras que en las enzimas diméricas se encuentra en la superficie de la proteína, esta sinapomorfía sugirió que la existencia de este residuo, cuya cadena lateral es la más pequeña de la de todos los aminoácidos, permitía el acercamiento de las subunidades en la unidad dimérica de manera tal que permitiera no sólo el establecimiento de las interacciones entre monómeros que forman y estabilizan al dímero, sino también las que un dímero forma con otro para dar lugar al tetrámero. Por ello pensamos que la mutación de esta glicina en la PaBADH podría llevar a la obtención de una enzima dimérica y/o monomérica. El análisis de la mutante conduciría a un mejor entendimiento de las bases estructurales de la oligomerización de las BADHs. Estos estudios pueden arrojar luz sobre el papel que la oligomerización juega en determinar la actividad catalítica. A este respecto es importante mencionar que hasta la fecha no se ha obtenido una ALDH dimérica a partir de una tetramérica, por lo que se desconoce si este cambio en el estado de agregación permitiría o no que se mantuviese la actividad catalítica. Tampoco se ha encontrado ninguna ALDH monomérica, ni actividad en los monómeros formados por disociación de ALDHs diméricas o tetraméricas (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003).

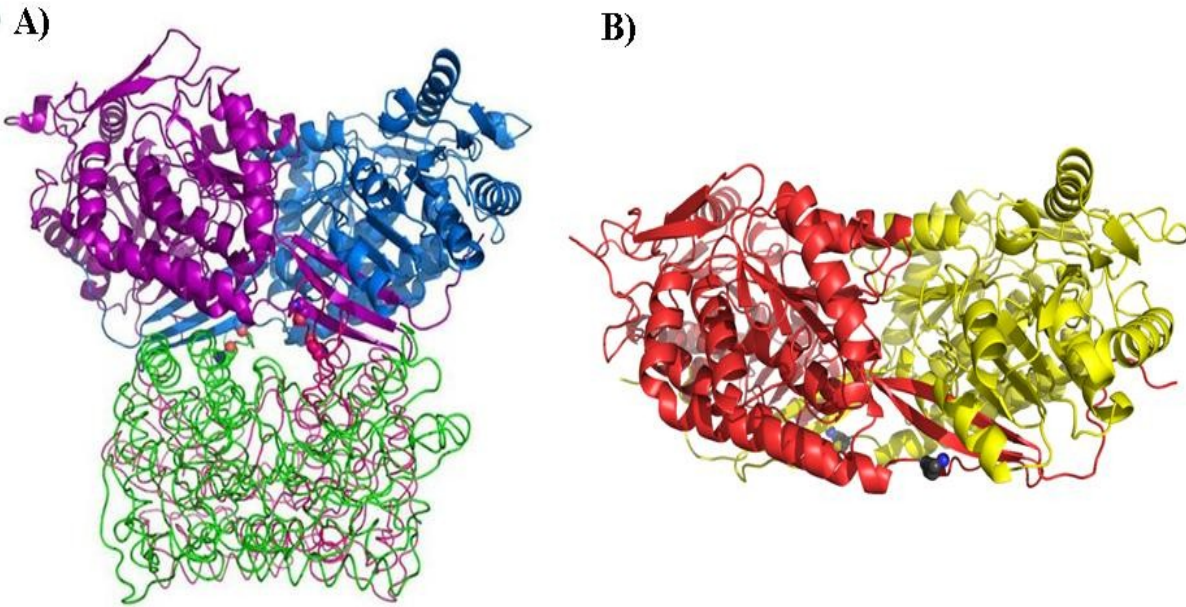


Figura 10. Estructuras de BADHs, (A) Tetrámero de la PaBADH código PDB 2wme. (B) Modelo de la BADH de espinaca (SpBADH) dimérica. En esferas se muestra el residuo de la posición 174 del alineamiento, que en el caso de la PaBADH tetramérica es una glicina (G125) que está conservada en las BADHs tetraméricas, mientras que en la SpBADH dimérica es una lisina (K127).

III. HIPÓTESIS

Si el residuo G125 es importante para mantener la estructura tetramérica nativa de la enzima, entonces, al mutarlo por un residuo de cadena lateral más voluminosa se impedirá la formación del tetrámero a partir de los dímeros, o se reducirá su estabilidad, lo que redundará en una alteración de las propiedades funcionales de la enzima.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Obtener una proteína PaBADH mutada en el residuo G125 (mutante G125K) y estudiar funcional y estructuralmente a la enzima resultante.

IV.2 Objetivos particulares

1. Obtener por mutagénesis sitio-dirigida el gen de la PaBADH mutado en el que la glicina en la posición 125 se haya cambiado por una lisina (mutante G125K), utilizando el gen de la enzima silvestre insertado en el vector de expresión pCALn de uso en *E. coli*.
2. Obtener la proteína mutada por transformación de células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3)-pLysS con el plásmido que contenga el gen mutado e inducir la síntesis de la enzima.
3. Purificar a homogeneidad la proteína PaBADH G125K obtenida a partir de las células transformadas.
4. Caracterizar funcionalmente a la enzima PaBADH G125K y comparar sus propiedades funcionales más relevantes con las de la enzima recombinante silvestre.
5. Caracterizar estructuralmente a la enzima PaBADH G125K y comparar sus propiedades estructurales con las de la enzima recombinante silvestre.

6. Determinar la estabilidad de la PaBADH G125K ante la desnaturalización química inducida por urea y la desnaturalización inducida por temperatura, y comparar esta estabilidad con la de la enzima recombinante silvestre.

V. MATERIALES

V.1 Equipos

Balanza analítica Ohaus; bomba peristáltica Pharmacia LKB-Pump P-1; cámara de agitación orbital con temperatura controlada de Lab Line Instruments; centrifuga Allegra 64R Beckman; centrífuga Sorvall RC-5 Plus; equipo de electroforesis para SDS-PAGE BIORAD y para geles de agarosa Gibco RBL; espectrofluorómetro RF- 5000U Shimadzu; espectrofotómetro PERKIN ELMER UV/VIS Lambda Bio 10; espectropolarímetro Jasco J-715; HPLC Waters; potenciómetro Beckman; sonicador Vibracell SONICS; termociclador Techne; transiluminador de luz UV; transiluminador de luz blanca y vórtex Thermolyne.

V. 2 Reactivos

De Sigma Aldrich: Acrilamida, ampicilina, ANS, azul de Coomassie Brillante R 250, betaína aldehído, bis-acrilamida, cloruro de potasio, DTT, EDTA, glicina, hidróxido de potasio, IPTG, medio de cultivo LB, metanol, 2-mercaptoetanol, β -NAD⁺ sal de sodio, β -NADP⁺ sal de sodio, persulfato de amonio, SDS y tris (hidroximetil-aminometano).

De J.T. Baker: Ácido acético glacial, ácido clorhídrico, fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico y glicerol anhidro.

De Invitrogen: Agarosa, medio de cultivo LB líquido y agar, urea.

De Merck: Azul de bromofenol.

De Fluka: Bromuro de etidio.

Kits comerciales: Miniprep (Invitrogen) y Quick Change XL-Site Directed Mutagenesis (Stratagene).

Columnas de cromatografía: Q-Sepharosa Fast Flow (General Electric); 2',5'-ADP Sepharosa (General Electric); Mono Q (General Electric) y Superdex 200 HR 10/30 (General Electric).

VI. MÉTODOS

VI.1 Modelaje estructural de proteínas

Éste se usó con un doble fin: el de hacer la mutagénesis *in silico* de la PaBADH y el de obtener un modelo de la enzima dimérica de espinaca, ya que en el momento de empezar este trabajo aún no se contaba con su estructura cristalográfica. Los dos estudios se realizaron con la ayuda del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM. El modelo de la SpBADH se basa en la estructura tridimensional de la aminoaldehído deshidrogenasa 2 de *Pisum sativum* (Tylichova, *et al.*, 2009) código PDB 3IWJ; primero se sometió el archivo pdb a un procedimiento llamado Rosetta design/HMMer (RdHmm), que genera numerosas secuencias de aminoácidos compatibles con el plegamiento original, pero sin restricciones de tipo funcional (sitios activos intercaras de oligomerización, etc). Las secuencias se usaron para generar un modelo estadístico llamado “modelo markoviano oculto” que se usa para determinar cuales secuencias de aminoácidos en la base de datos NCBI/nr son consistentes con el modelo HMMer y, por lo tanto, se podrían “enhebrar” en la estructura 3D de la proteína analizada. Este procedimiento proporciona un alineamiento de las secuencias con el molde. Este alineamiento, para la secuencia de la BADH de espinaca se usó para alimentar al programa MODELLER 9v4 (Sally *et al.*, 2008) y generar 25 modelos. Los 25 modelos se sometieron al procedimiento RdHmm, ahora para obtener una calificación de pertenencia. Una vez obtenido se formó el dímero usando la misma geometría que el cristal 3IWJ y este dímero se minimizó usando el campo de fuerzas GROMOS G53a6 en el programa Gromacs 3.3 (Lindhal *et al.*, 2003).

Para la mutación *in silico* de la G125 por una lisina se usaron las coordenadas cristalográficas de la PaBADH obtenidas a partir del patrón de difracción de rayos X (González-Segura *et al.*, 2009) y el programa computacional HyperChem® 7.5. Se hizo una optimización de geometría utilizando el campo de fuerza AMBER para obtener una estructura estable. El programa PyMOL 2.0 (DeLano, 2002) se usó para la visualización de las estructuras tridimensionales de la PaBADH y de otras ALDHs, así como para la realización de las figuras de estructuras de proteínas.

VI.2 Obtención de la mutante PaBADH G125K

VI.2.1 Diseño y síntesis de oligonucleótidos para la mutagénesis sitio dirigida

Los oligonucleotidos para realizar la mutación G125K se diseñaron con base en la secuencia del gen de la PaBADH y al manual del kit Quick Change XL-Site Directed Mutagenesis (Stratagene). Los oligonucleótidos constan de 33 y 32 nucleótidos con una T_m de 86.9 °C y 85.35 °C para los oligos de sentido y antisentido respectivamente. Éstos fueron sintetizados en la unidad de síntesis de oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

G125K Sentido: 5' ccggccatcgaaa**agg**gagcagattcccctgcg 3'

G125K Antisentido: 5' cgcaggggaatctgctc**cttt**tcgatggccgg 3'

En negritas se indican las bases cambiadas.

VI.2.2 Purificación del plásmido pCAL-betB

El plásmido pCAL-betB (consistente en el gen de la BADH silvestre (*betB*) insertado en el plásmido pCALn) (Velasco-García *et al.*, 2006a), se purificó a partir de células de *E. coli* de la cepa BL21(DE3)-pLysS (Stratagene) que contienen este plásmido con el kit comercial Miniprep (Invitrogen). Las bacterias se crecieron durante doce horas hasta alcanzar la fase estacionaria en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina 50 μgml^{-1} , a 37 °C y con una agitación de 250 rpm. El DNA plasmídico obtenido se almacenó a -80 °C hasta su utilización en la PCR.

VI.2.3 Mutagénesis sitio-dirigida y amplificación por PCR

La mutagénesis se realizó por PCR, utilizando el kit comercial *Quick Change XL-Site Directed Mutagenesis* (Stratagene) que usa a la DNA polimerasa *Pfu Turbo*. En la PCR se realizaron 18 ciclos bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 50 s, alineamiento a 60 °C durante 50 s, extensión a 68 °C por 7 min. Finalmente el producto de la PCR fue tratado con la enzima *DpnI* durante 1 h a 37 °C para eliminar el DNA parental metilado.

VI.2.4 Transformación de células de *E. coli* y sobreexpresión de la PaBADH G125K

Se colocaron 45 μ l de células competentes de *E. coli* XL10 Gold (Stratagene) en tubos Falcon de 1.5 ml preenfriados a los que se agregaron 2 μ l del producto de la PCR. La mezcla se incubó en hielo por 30 min y posteriormente se sumergió en un baño de agua a 42 °C por 30 s. Después de 2 min en hielo, se agregaron 0.5 ml de medio LB precalentado a 37 °C. El tubo se mantuvo a 37 °C en agitación a 250 rpm por una hora. Se tomaron 250 μ l de esta solución y se esparcieron en una caja Petri con LB y ampicilina 50 μ gml⁻¹ y se incubó a 37 °C durante toda la noche.

De las colonias transformantes se tomó una al azar y se resembró en 50 ml de medio LB con ampicilina 50 μ gml⁻¹. Se incubó a 37 °C por 12 hrs en agitación constante a 250 rpm. Se extrajo DNA de estas bacterias con el que por choque térmico se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS (Stratagene). Dos colonias resistentes a ampicilina, elegidas al azar, se conservaron en congelación a -80 °C en LB-glicerol, y a partir de éstas se purificó el plásmido que se usó para su secuenciación y sobreexpresión de la proteína mutada. La secuenciación se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, confirmándose la presencia de la mutación.

Para la sobreexpresión de la proteína mutante, las células se crecieron en medio LB líquido con ampicilina 50 μ gml⁻¹ hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm. Se agregó entonces IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se mantuvo el cultivo en agitación a 250 rpm a 37 °C por 4 hrs.

VI.2.5 Obtención de extractos libres de células

Después de la inducción de la expresión de la proteína, la suspensión celular se centrifugó a 27,476 g durante 10 min a 4 °C y se desechó el sobrenadante. El botón bacteriano se resuspendió en 10 ml del amortiguador de extracción (amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 6.5, glicerol 10 % (v/v), KCl 50 mM y β - mercaptoetanol 20 mM). Se hizo la lisis celular mediante ultrasonido a 35 % de amplitud en un equipo Sonics VibraCell de 500 W, durante 10 min con pulsos y descansos de 30 s cada uno. Se centrifugó la suspensión a 27,476 g durante 20 min a 4 °C. Por último, se colectó el sobrenadante y se determinó la actividad de la PaBADH.

VI.2.6 Medida de la actividad enzimática

La actividad enzimática se determinó espectrofotométricamente mediante un ensayo estándar ya descrito (Velasco-García *et al.*, 1999), siguiendo un incremento en la absorbancia a 340 nm debida a la

formación de NADP(H), para lo cual se usó un espectrofotómetro PERKIN ELMER UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 10. La temperatura del medio de reacción se mantuvo constante a 30 °C por medio de un sistema de recirculación de agua. El medio de reacción consiste en betaína aldehído 0.3 mM y NAD(P)⁺ 0.5 mM en amortiguador de fosfatos (KH₂PO₄/K₂HPO₄) 100 mM, pH 8.0, en un volumen final de 500 µl. La reacción se inició con la adición de 1 µl de la preparación de enzima, con una concentración final en la mezcla de reacción de 0.05 a 2.5 µgml⁻¹.

La actividad enzimática de la PaBADH se calculó de la siguiente manera:

$$\Delta E = \Delta A \left[\frac{1}{\text{---}} \right] \left[\frac{1}{V} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

En donde, ΔE es la actividad enzimática (Uml⁻¹), ΔA es el incremento de la absorbancia a 340 nm, ϵ es el coeficiente de absortividad molar del NAD(P)H a 340 nm (6.22 $\times 10^3$ M⁻¹cm⁻¹) (Horecker y Kornberg, 1948) y V es el volumen de enzima usado en el ensayo.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 µmol de NAD(P)H por min en nuestras condiciones experimentales. Para el cálculo de la actividad específica (Umg⁻¹ de proteína) se determinó la concentración de la PaBADH espectrofotométricamente, usando el coeficiente de absortividad molar, $\epsilon_{280\text{nm}}$ de 52060 M⁻¹cm⁻¹ calculado a partir de la secuencia de aminoácidos de la PaBADH según el método reportado por Gill y von Hippel (1989).

VI.2.7 Purificación de la PaBADH G125K

La PaBADH mutada se purificó de acuerdo a la metodología descrita por Velasco-García *et al.* (1999) y a la modificación descrita en González-Segura *et al.* (2005). Este protocolo consiste en el paso del extracto libre de células a través de una columna de intercambio iónico Q-Sepharose Fast Flow

(General Electric) y la elución de la enzima con un gradiente creciente de KCl (50-350 mM). Las fracciones con presencia de BADH se sometieron a cromatografía de afinidad 2',5'-ADP Sepharose (General Electric), que se eluyó con un gradiente de pH (6.5-8.5). Todos estos pasos fueron realizados a una temperatura de 4 °C.

Siguiendo este protocolo de purificación no fue posible obtener la enzima completamente pura por lo que la muestra fue sometida a otro paso de cromatografía de intercambio iónico de mayor poder de resolución, usando la resina Mono Q (General Electric) y eluyendo con un gradiente de KCl de 50 a 350 mM. La enzima recuperada se almacenó a -80 °C en alícuotas, en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 6.9, KCl 250 mM, glicerol 10 % (v/v), β -mercaptoetanol 10 mM y EDTA 1 mM.

VI.3 Electroforesis

VI.3.1 De DNA en geles de agarosa

Con la finalidad de comprobar la presencia y/o amplificación de DNA, los productos de la purificación del plásmido y de la PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v). Cada gel se preparó fundiendo la agarosa en amortiguador TAE (Tris 4 mM, acetato de sodio 8 mM, EDTA 100 μ M, pH 7.5 ajustado con ácido acético glacial) y se le adicionó bromuro de etidio 0.05 μ gml⁻¹. A cada muestra se le agregó amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25 %, xilén-cianol 0.25 % y glicerol 50 % (v/v)) para tener una dilución 1:10. Se cargaron 10 μ l de muestra en los carriles del gel. Cada gel se corrió durante aproximadamente una hora, inmerso en amortiguador TAE. El revelado de los geles se hizo mediante irradiación con luz UV.

VI.3.2 Desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para seguir el proceso de purificación y determinar el grado de pureza de la PaBADH mutada, se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones reductoras usando β -mercaptoetanol y SDS como agente desnaturalizante (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970). Bajo estas condiciones, la

migración de las proteínas se debe a su masa molecular y no a su carga ya que éstas se comportan como partículas lineales con densidad de carga negativa homogénea. En todos los casos se utilizaron geles con una zona de concentración de 4 % (v/v) de acrilamida a pH 6.8 y otra de separación de las proteínas de 10 % (v/v) de acrilamida a pH 8.3. Los geles se corrieron a un potencial de 115 V y una intensidad de corriente de 20 mA. Cuando terminó la corrida, se prosiguió a la fijación de las proteínas con una solución de metanol al 50 % (v/v). El revelado de los geles se hizo con una solución de azul brillante de Coomassie 0.125 % (p/v), metanol al 50 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v). El exceso de colorante se eliminó con una disolución acuosa de metanol al 50 % (v/v) y ácido acético al 10 % (v/v).

VI.4 Determinación de la unión del NAD(P)⁺

Las constantes de disociación de la interacción de los dinucleótidos con la enzima PaBADH G125K se determinaron siguiendo el apagamiento de la fluorescencia intrínseca de la proteína producido por la unión del dinucleótido. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofluorómetro RF- 5000U (Shimadzu) a temperatura constante de 30 °C. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 296 nm y se registró la emisión en el intervalo de 300 a 450 nm (con un ancho de banda de 5 nm). La concentración de enzima utilizada fue de 50 µgml⁻¹. El efecto del filtro interno debido al NAD(P)⁺ se corrigió midiendo la absorbancia a 296 y 335 nm y utilizando la Ecuación 2 (Lakowics, 1983).

$$F_c = F_{\text{obs}} \times 10^{(A_{\text{ex}} + A_{\text{em}})/2} \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde F_c es la fluorescencia corregida, F_{obs} es la fluorescencia observada y A_{ex} y A_{em} son la absorbancia a la longitud de onda de excitación y de emisión respectivamente.

Las titulaciones de NAD(P)⁺ se llevaron a cabo con adiciones consecutivas de soluciones concentradas de los dinucleótidos en la celda de fluorescencia. Las disoluciones se equilibraron 2 min después de cada adición antes de la lectura de fluorescencia. Los valores de fluorescencia fueron corregidos por el efecto de la dilución de la enzima. Los resultados se presentan como porcentaje de la inicial y se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$\frac{F}{F_0} = \frac{F_{\text{max}}[\text{NAD(P)}^+]^{nH}}{L_{0.5} + [\text{NAD(P)}^+]^{nH}} \quad \text{Ecuación 3}$$

En donde ΔF es la diferencia en la intensidad de fluorescencia de la proteína en ausencia y presencia de nucleótido; $\Delta F_{\text{máx}}$ es la diferencia cuando la enzima está completamente saturada con el NAD(P)⁺; $L_{0.5}$ es un parámetro de unión del NAD(P)⁺ a la enzima e indica la concentración de ligando con la que se tiene la mitad del cambio máximo de fluorescencia, es decir el 50% de saturación, y n_H es el número de Hill que indica el grado de cooperatividad entre las subunidades.

VI.5 Caracterización estructural de la PaBADH G125K

VI.5.1 Cromatografía de exclusión molecular

El estado de agregación de la enzima se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular. Este procedimiento se llevó a cabo utilizando la columna Superdex 200 HR 10/30 (General Electric) conectada a un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia (sistema HPLC, Waters). La columna fue equilibrada y eluida a temperatura ambiente usando un flujo de 0.5 mlmin⁻¹ y el siguiente amortiguador: fosfatos 10 mM pH 6.9, EDTA 1 mM, glicerol 10 % (v/v), β -mercaptoetanol 10 mM y KCl 250 mM. La columna se calibró con la PaBADH silvestre y se registraron los perfiles de elución midiendo la absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas. Posteriormente se compararon los perfiles de elución de la PaBADH silvestre y de la PaBADH G125K.

VI.5.2 Fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos y extrínseca del ANS

La estructura terciaria de la mutante se estudió por medio de la fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos y de la fluorescencia extrínseca del 8-anilino-1-naftaleno sulfonato (ANS). Los espectros de fluorescencia se obtuvieron a 25 °C en un espectrofluorómetro RF- 5000U (Shimadzu). En ambos casos se utilizó una celda de cuarzo de 1 cm de paso de luz y concentración de enzima utilizada de 50 μ gml⁻¹. La fluorescencia de los aminoácidos aromáticos se determinó excitando a 280 nm y midiendo la emisión entre 300 y 500 nm, con anchos de banda de excitación y de emisión

de 3 nm. Para la fluorescencia extrínseca, la proteína se incubó en una solución con 0.3 mM de ANS en la oscuridad por 20 min. La longitud de onda de excitación fue de 370 nm y el espectro de emisión de fluorescencia del ANS se registró en el intervalo de 400 a 600 nm usando anchos de banda de excitación y de emisión de 5 nm.

El centro espectral de masa (CEM) se calculó a partir de los datos de intensidad de fluorescencia (I_λ) obtenidos a diferentes longitudes de onda (λ), de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$CEM = \frac{\sum I_\lambda \lambda}{\sum I_\lambda} \quad \text{Ecuación 4}$$

VI.5.3 Dicroísmo circular

Los posibles cambios en la estructura secundaria producidos por la mutación se exploraron por dicroísmo circular (DC). Las mediciones de DC se llevaron a cabo en la región del UV-lejano en el intervalo de 205 a 250 nm en un espectropolarímetro Jasco J-715 (Jasco Inc., Easton MD, USA) acoplado a un controlador de temperatura tipo Peltier Jasco 423S. Las muestras de proteína, a una concentración de 0.25 mgml⁻¹ en el siguiente amortiguador: fosfatos 10 mM pH 6.9, glicerol 10 % (v/v), EDTA 1 mM y DTT 0.5 mM, se colocaron en una celda de cuarzo con un paso de luz de 0.1 cm. La temperatura a la que se tomaron los espectros fue de 20 °C y se hizo el promedio de dos mediciones.

VI.6 Análisis de la estabilidad de la PaBADH G125K frente a la desnaturalización con urea

VI.6.1 Preparación de disoluciones concentradas de urea

Se sabe que las disoluciones de urea se descomponen para dar lugar a la formación de iones amonio y cianato. Los iones cianato pueden interaccionar con los grupos amino y tiol de las proteínas, por lo que las disoluciones empleadas siempre se prepararon al momento de ser utilizadas. En primer lugar se pesó la cantidad deseada de urea y se llevó al volumen final deseado en el amortiguador en que se encuentra almacenada la enzima; después se filtró la disolución con un filtro de 0.22 µm. Para

determinar con exactitud la concentración de la disolución de urea se utilizó la medida del índice de refracción n (Warren y Gordon, 1966). La diferencia entre el índice de refracción de la disolución de urea y la del amortiguador acuoso ($\Delta n = n_{\text{disolución de urea}} - n_{\text{amortiguador}}$) se relaciona con la concentración de urea de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$[\text{Urea}] = 117.66 \Delta n + 29.753 (\Delta n)^2 + 185.568 (\Delta n)^3 \quad \text{Ecuación 5}$$

VI.6.2 Incubaciones con urea

Las enzimas PaBADH silvestre y la mutante G125K ($50 \mu\text{gml}^{-1}$ en las condiciones mencionadas en la sección VI.2.7) se incubaron con concentraciones crecientes de urea de 0 a 7.5 M por cero y doce horas. Se midió el espectro de emisión de fluorescencia registrándose la λ máxima de emisión para cada concentración de urea. Se tomaron lecturas posteriores a las 12 hrs de incubación y se comprobó que los parámetros antes mencionados no variaron. Los datos crudos fueron normalizados y se presentan como fracción desnaturalizada (%), asumiendo un modelo de dos estados utilizando la siguiente ecuación (Ecuación 6):

$$\text{Fracción desnaturalizada (\%)} = \frac{Y - Y_D}{Y_N - Y_D} (100) \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde Y es la señal registrada de fluorescencia intrínseca o de dicroísmo circular; Y_D es la señal en el estado desnaturalizado y Y_N corresponde a la señal en el estado nativo.

Los datos se ajustaron a una ecuación de Boltzman (Ecuación 7) por regresión no lineal utilizando el programa MicroCalOrigin 5.0 (Microcal Software, Inc).

$$\text{Fracción desnaturalizada (\%)} = \frac{A_1 \square A_2}{1 + e^{(([\text{urea}] - C_m)/m)}} + A_2 \quad \text{Ecuación 7}$$

En donde A_1 representa el valor de la señal antes de la transición (región pre-transición) y A_2 representa el valor de la señal después de la transición (región post-transición de la curva de desnaturalización), C_m es la concentración de urea a la que se tiene el 50 % de la proteína desnaturalizada, y m es la pendiente de la curva en el punto de inflexión e indica el grado de cooperatividad del proceso.

VI.7. Análisis de la estabilidad de la PaBADH G125K frente a la desnaturalización térmica

La estabilidad térmica de las enzimas silvestre y mutante G125K (250 µgml⁻¹) se siguió por dicroísmo circular utilizando el espectropolarímetro y las condiciones antes mencionadas (sección VI.5.3). Se siguió el cambio de elipticidad a 222 nm en un intervalo de temperatura de 20-80 °C, usando una velocidad de calentamiento de 1 °C por min. Los datos obtenidos se ajustaron a la suma de dos ecuaciones sigmoideas de Boltzman (Ecuación 8).

$$\text{Fracción desnaturalizada (\%)} = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{-(T - T_{m1})/m1}} + \frac{A_3 - A_4}{1 + e^{-(T - T_{m2})/m2}} + A_2 \quad \text{Ecuación 8}$$

En donde A1 y A2 representan el valor de la señal antes y después de la transición 1 y A3 y A4 representan el valor de la señal antes y después de la transición 2; T_{m1} es la temperatura a la que se tiene el 50 % de la proteína desnaturalizada y m₁ es la pendiente de la curva en el punto de transición e indica el grado de cooperatividad del proceso. Los parámetros, T_{m2}, y m₂ corresponden a la segunda transición.

VII. RESULTADOS

VII.1 Mutación *in silico* de la G125 por lisina

Como primer paso se seleccionó el residuo de aminoácido con el que sustituiríamos a la glicina, realizando mutagénesis *in silico* de la G125 para tratar de inferir las posibles consecuencias estructurales que tendría su mutación. Se buscó que el cambio realizado impidiera la formación del tetrámero, pero no el plegamiento del dímero, por lo que se decidió obtener una enzima mutante en la que la glicina se sustituyera por lisina, a la que llamaremos G125K. En la Fig. 11 se muestra el modelo obtenido tras la mutación *in silico* y la minimización de energía.

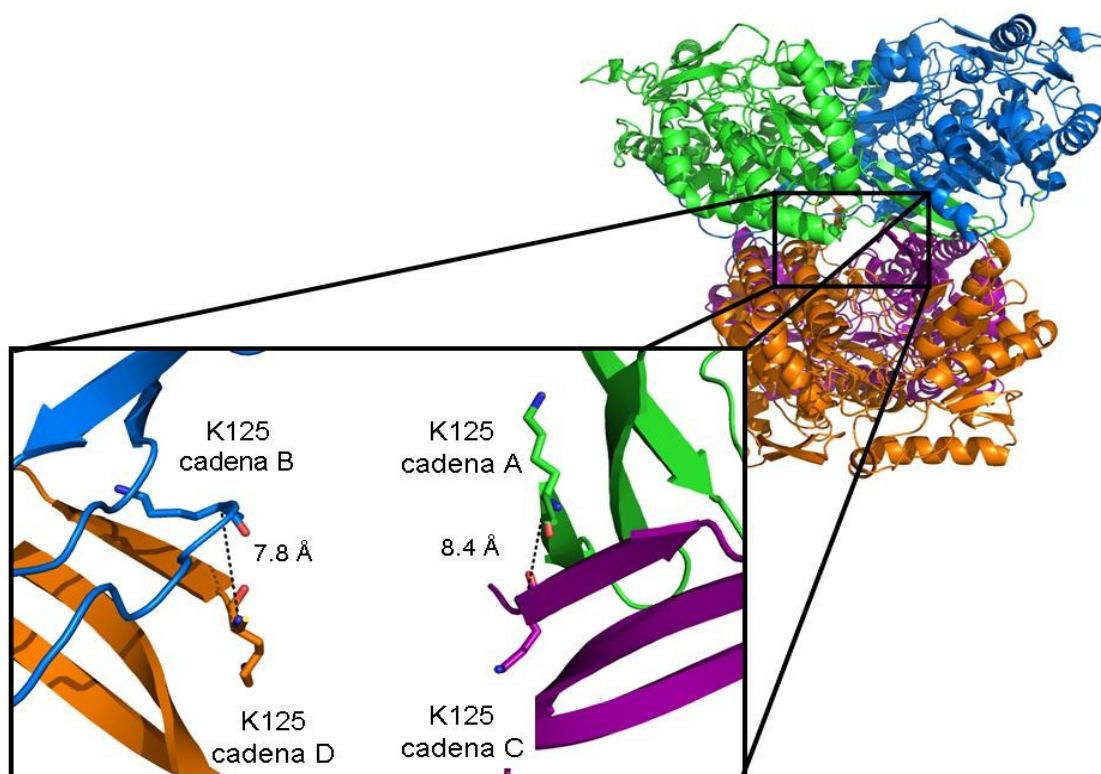


Figura 11. Modelo de la PaBADH G125K. En el recuadro se amplía el lugar en dónde se encuentra la mutación. Los residuos de lisina se muestran como bastones. Se muestra además la distancia que existe entre los carbonos α de este residuo en subunidades enfrentadas.

Este modelo mostró que la cadena lateral del residuo de lisina posiblemente se orientaría hacia adentro de su misma subunidad, de manera que esta mutación no produciría choques estéricos en las intercaras con la subunidad enfrentada.

En la PaBADH silvestre tanto el O como el N de la cadenas principal del residuo G125 se encuentran interaccionando con la cadena principal del residuo Q127 de la subunidad opuesta, es decir, A con C, y viceversa, y B con D y viceversa, ya que ambos residuos forman parte de dos hebras de una gran hoja β plisada antiparalela que se forma al asociarse las subunidades (Fig. 12). Sin embargo, en el modelo obtenido de la mutante G125K estas interacciones sólo están presentes entre las subunidades A y C a una distancia similar (2.8-3 Å) a las encontradas en la silvestre (Fig. 13).

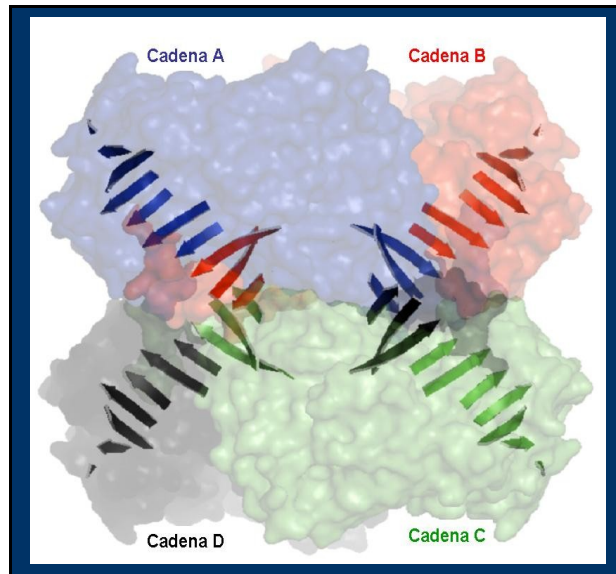
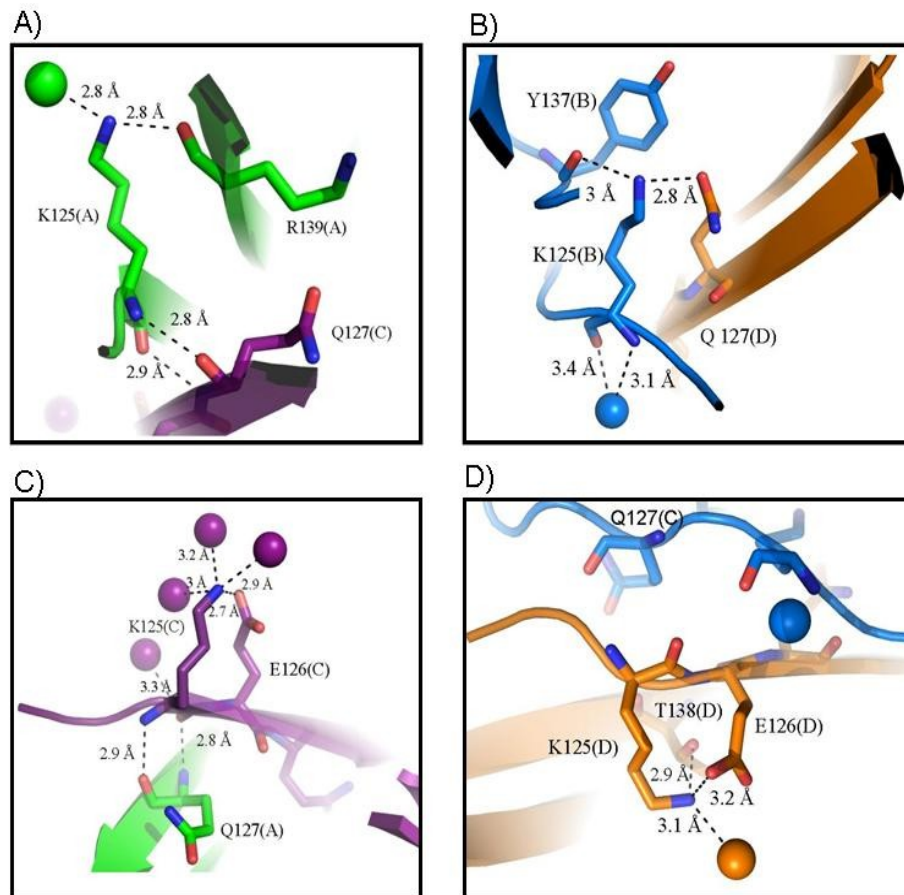


Figura 12. Estructura tridimensional del tetrámero de la BADH mostrando las 20 hebras que forman hojas plisadas β entre las subunidades del tetrámero (A con B y C con D) y su continuación con la formada entre las subunidades enfrentadas de dos dímeros. Tomado de Muñoz-Clares y Valenzuela-Soto (2008).

El modelo predice que el residuo K125 interaccionaría de forma distinta en cada subunidad (Fig. 13), como se describe a continuación: En el caso de la subunidad A, el NE podría formar puentes de hidrógeno con una molécula de agua (2.8 Å) y con el O del carbonilo de la cadena principal de la R139 de la misma subunidad (2.8 Å), mientras que los átomos de la cadena principal de K125 podrían formar puentes de hidrógeno con la cadena lateral del residuo Q127 de la subunidad C. Para la subunidad B, el modelo predijo que el NE podría formar puentes de hidrógeno con el O de la cadena lateral de la Y137 de la misma subunidad B (3 Å) y con el O de la amida de la cadena lateral de la Q127 de la subunidad D (2.8 Å) mientras que el N de la cadena principal puede formar puente de hidrógeno con una molécula de agua (3.4 Å) al igual que el O del carbonilo de la cadena principal de la Y137 (3.1 Å). En la subunidad C, el NE podría formar tres puentes de hidrógeno con tres moléculas de

agua, además de hacer un puente salino con un O del grupo carboxilo del E126 de la misma subunidad C. El N de la cadena principal de la lisina donaría un puente de hidrógeno al O de la cadena principal de la Q127 de la subunidad A (2.9 Å), mientras que el O del carbonilo del grupo amida de la lisina interaccionaría con una molécula de agua (3.3 Å) y con el N de la cadena principal de la Q127 (2.8 Å). Esta última interacción es parte de las interacciones entre las dos hebras de la hoja plisada β . En la subunidad D el NE podría formar dos puentes de hidrógeno, uno con una molécula de agua (3.1 Å) y otro con el O del carbonilo de la cadena principal de la T138 de la misma subunidad D (2.9 Å), además de formar un puente salino con el E126 de la subunidad D (3.2 Å).



A pesar de estas predicciones, decidimos hacer la mutagénesis para comprobar en forma experimental su efecto sobre la función y estructura de la enzima.

VII. 2 Obtención de la PaBADH G125K

Se realizó la mutagénesis sitio-dirigida para obtener la mutante PaBADH G125K como se describe en Métodos, comprobándose mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 14) que sí ocurrió la

amplificación del gen mutado. El plásmido resultante de la PCR, al que llamaremos pCAL-betBG125, tiene un tamaño superior a 5 kpb, coincidiendo con el tamaño esperado de 7.3 kpb. Como era de esperarse, el control negativo, en el que no se añadió DNA molde a la mezcla de reacción de la PCR, no produjo ninguna banda.

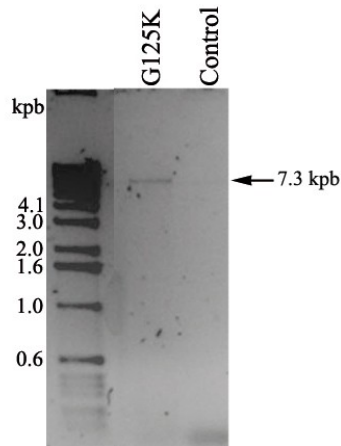


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el producto de la PCR de la mutación G125K. En el carril correspondiente se observa una única banda, señalada con una flecha, del tamaño esperado.

Con el plásmido pCAL-betBG125K se transformaron células de *E. coli* de la cepa XL10 Gold (Stratagene) obteniéndose numerosas colonias resistentes a ampicilina que contenían el plásmido pCAL-betBG125K. A partir de una de estas colonias transformantes se purificó este plásmido, el que se utilizó para transformar a la cepa de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS (Stratagene). (Fig. 15).



Figura 15. (A) Colonias de células de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS (Stratagene) transformadas con el plásmido pCAL-betBG125K. (B) Análisis electroforético de plásmidos purificados a partir de cuatro de estas colonias transformantes (plásmidos no linealizados).

VII.2.1 Secuenciación del ADN mutado

Para confirmar si la mutación puntual estaba presente, se purificó el DNA plasmídico a partir de células de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS transformadas, usando el kit de purificación Minipred (Invitrogen) según se describió en Métodos. Una vez obtenido, se secuenció en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, confirmándose la presencia de la mutación (Fig. 16). Sólo se muestra el alineamiento de la secuencia obtenida usando un oligo, sin embargo, el gen se secuenció completamente y se encontró que no existía ningún otro cambio en el resto del gen.

```
PaBADH silvestre 10 YIGGRYVEASSGATFETINPANGEVLAKVQRASREDVERAVQSAVEGQKVWAAMTAMQRS 69
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PaBADH G125K    10 YIGGRYVEASSGATFETINPANGEVLAKVQRASREDVERAVQSAVEGQKVWAAMTAMQRS 69

PaBADH silvestre 70 RILRAVDILRERNDELA ALETLDTGKPLAETRSVDIVTGADVLEYYAGLVP AIEG EQIP 129
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PaBADH G125K    70 RILRAVDILRERNDELA ALETLDTGKPLAETRSVDIVTGADVLEYYAGLVP AIEK EQIP 129

PaBADH silvestre 130 LRETSFVYTRREPLGVVAGIGAWNYPVQIALWKSAPALAAGNAMIFKPSEVTPLTALKLA 189
      |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
PaBADH G125K    130 LRETSFVYTRREPLGVVAGIGAWNYPVQIALWKSAPALAAGNAMIFKPSEVTPLTALKLA 189

PaBADH silvestre 190 EIYTEAGVPDGVFNVL TGS 208
      ||||||||||||||
PaBADH G125K    190 EIYTEAGVPDGVFNVL TGS 208
```

Figura 16. Alineamiento de la región de la secuencia de la PaBADH silvestre con la de la mutante G125K en donde se encuentra el residuo cambiado (mostrado en negritas).

VII.2.2 Sobreexpresión y purificación de la mutante G125K

A partir de las células de *E. coli* BL21(DE3)-pLysS transformadas con el plásmido pCAL-betBG125K se obtuvo la proteína mutante G125K de la PaBADH, como se describe en Métodos. La mayor parte de ella se obtuvo en forma soluble (Fig. 18), pero a pesar de ello no se detectó actividad PaBADH en el extracto libre de células. Este resultado indicaba que si bien la proteína sí era capaz de plegarse, la estructura tridimensional resultante tenía un sitio activo seriamente alterado. Una porción menor pero importante de la enzima se obtuvo como cuerpos de inclusión, lo que muestra que ésta no es una proteína muy estable bajo las condiciones en que se llevó a cabo la sobreexpresión.

Con el fin de hacer una caracterización estructural más a fondo, procedimos a purificar la enzima mutada, para lo cual se siguió inicialmente el protocolo reportado para la enzima silvestre por Velasco-García *et al.* (1999) con la modificación descrita en González-Segura *et al.* (2005). Ya que la enzima mutante no mostró actividad, su presencia durante la purificación se tuvo que detectar mediante SDS-PAGE. El primer paso de purificación consiste en una cromatografía de intercambio iónico en Sefarosa Q de Flujo Rápido (QFF, por sus siglas en inglés). La Fig. 17 muestra el contenido en proteína PaBADH de las distintas fracciones del eluato de esta columna. Se reunieron las fracciones 35-45, en las que la proteína de interés estaba bastante enriquecida, y se aplicaron a la columna de afinidad 2',5'-ADP Sefarosa. La proteína mutada no se unió a la resina de afinidad, por lo que se extrajo de ésta en la fracción no unida y en la solución de lavado de la columna, sin haberse logrado un grado de purificación significativamente mayor al obtenido en el paso cromatográfico anterior, como se comprobó por SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie (Fig. 18, carriles 7 y 8). La elución de la columna 2',5'-ADP Sefarosa con un gradiente de pH, que es el método seguido en la purificación de la enzima silvestre, permitió observar una ligera banda de proteína en la fracción esperada, pero la proteína estaba a muy baja concentración y al ser concentrada y hacerle un gel SDS-PAGE se vio que no estaba pura (Fig. 18, carril 9). Puesto que la 2',5'-ADP Sefarosa es una resina utilizada para purificar enzimas que usan NADP⁺ como coenzima, como es el caso de la PaBADH, el hecho de que la mutante PaBADH G125K prácticamente no se una a esta resina indica que la enzima no une, o une muy pobremente, a este nucleótido.

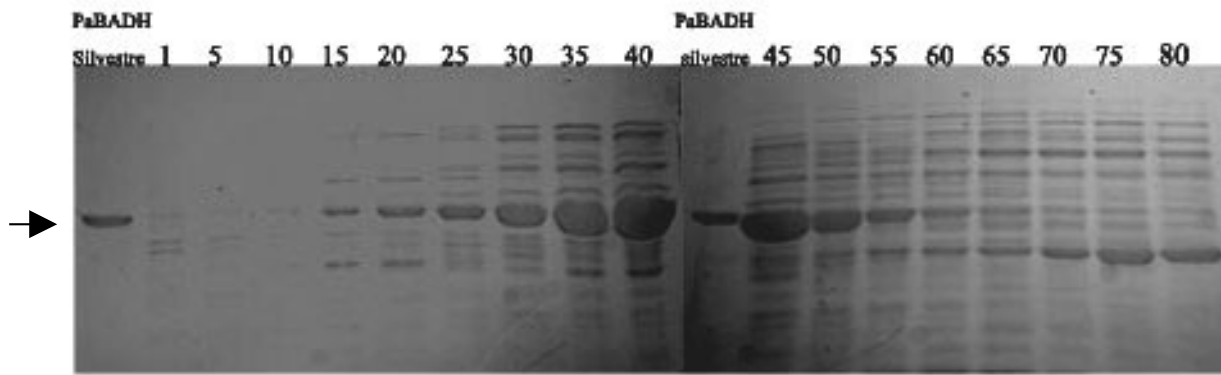


Figura 17. SDS_PAGE de las fracciones eluidas de la columna QFF. La PaBADH G125K, no presentó actividad BADH por lo que fue necesario detectar su presencia mediante un gel SDS-PAGE. Se reunieron las fracciones 35-45.

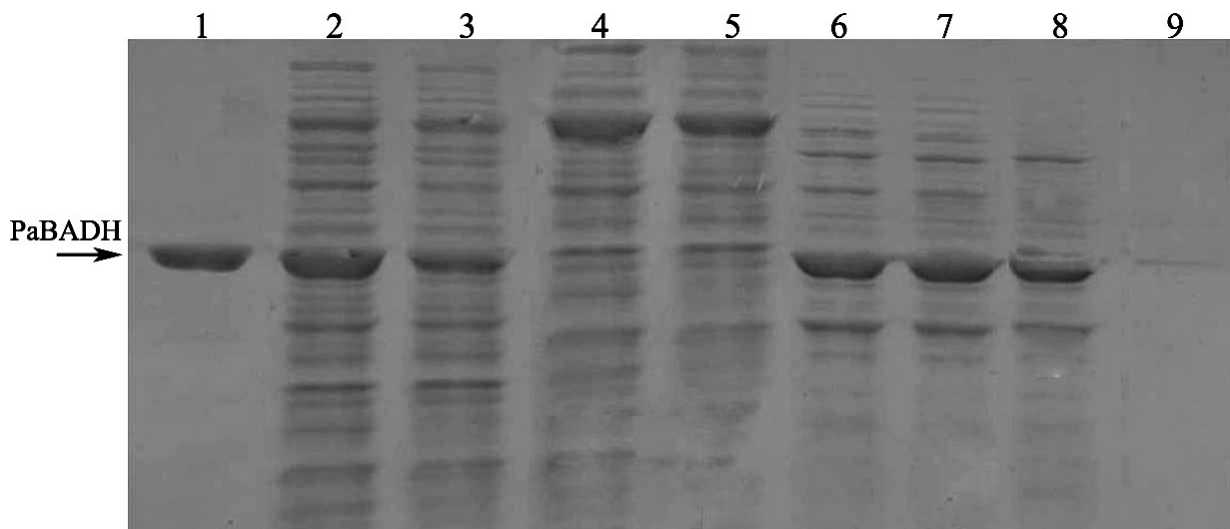


Figura 18. SDS-PAGE de las muestras de los diferentes pasos de purificación de la PaBADH G125K. Carriles: 1. PaBADH silvestre pura. 2. Sobrenadante del extracto libre de células de *E. coli*. 3. Precipitado del extracto libre de células. 4. Fracción no unida a la columna QFF. 5. Lavado de la columna QFF. 6. Fracciones reunidas de la columna QFF. 7. Fracción no unida de la columna de afinidad. 8. Lavado de la columna de afinidad. 9. Fracciones eluidas de la columna de afinidad.

Se decidió reunir a la fracción no unida y a la del lavado y pasarlas nuevamente por la columna de afinidad, pero esta vez fraccionando lo que se obtiene de la columna por si esto permitía al menos obtener un enriquecimiento de la proteína. Los resultados, mostrados en la Fig. 19, indican que la mayor parte de la proteína sale en la fracción no unida y en las primeras fracciones del lavado, por lo que no es posible lograr una mayor purificación usando la cromatografía de afinidad de la que se había logrado usando el paso previo de purificación en cromatografía de intercambio iónico.

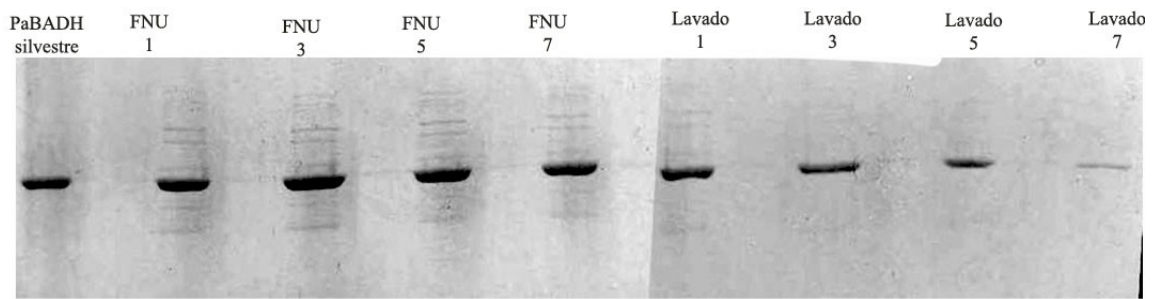


Figura 19. SDS-PAGE de las fracciones de la cromatografía de afinidad que se reunieron y se pasaron nuevamente por la columna 2',5'-ADP Sefarosa, fraccionando en esta ocasión el volumen en el que sale la proteína no unida y el lavado de la columna. Se observa que prácticamente toda la proteína sale en la fracción no unida y en las primeras fracciones del lavado y que no se obtuvo una mejora significativa en la purificación.

Sometimos entonces la proteína a otra cromatografía de intercambio iónico Mono Q y se eluyó con un gradiente de KCl de (50-350 mM) en un sistema acoplado a un HPLC. Se obtuvo un pico simétrico de proteína, muy bien separado de otros pequeños picos de proteínas contaminantes. Las fracciones reunidas de este pico se analizaron por SDS-PAGE. Se observó una única banda, comprobándose así que se había obtenido la enzima totalmente pura (Fig. 20B). Esta preparación fue la usada para los estudios posteriores de caracterización estructural y funcional, que se describen a continuación.

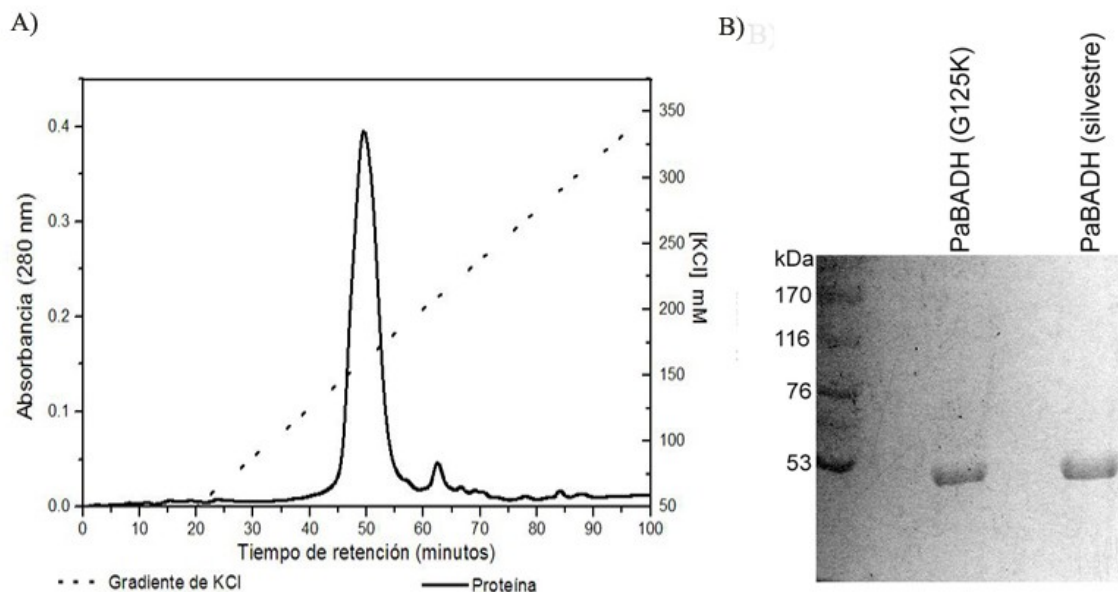


Figura 20. (A) Perfil de elución de proteínas de la columna Mono Q (línea continua). Se aplicó un gradiente de KCl de 50-350 mM, mostrado por la línea punteada. Los primeros 20 min de la corrida corresponden al lavado de la columna. (B) Gel SDS-PAGE mostrando la pureza de la proteína PaBADH G125K después de este último paso de purificación.

VII.3 Determinación de la unión del NAD(P)⁺ al sitio activo de la PaBADH G125K

Debido a que la enzima PaBADH G125K no se pudo purificar con la columna de afinidad 2',5' ADP-Sefarosa y que además no tiene actividad de BADH, se pensó que ambos resultados se debían a la incapacidad de la enzima de unir al NAD(P)⁺. Para comprobarlo se determinó la constante de disociación de la unión del NAD(P)⁺ a la mutante, usando para ello los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína que producen los nucleótidos al unirse a la enzima (Velasco-García *et al.*, 2000).

Se encontró que la intensidad de la fluorescencia intrínseca de la PaBADH G125K sí se apagaba en presencia de NAD(P)⁺, incrementándose este apagamiento a medida que se iba incrementando la concentración del nucleótido, lo que indica que la enzima sí une a los nucleótidos. Sin embargo, se requieren de concentraciones de NAD(P)⁺ mucho mayores que las utilizadas con la enzima silvestre para llegar a la saturación de la enzima mutante. De hecho, no fue posible saturar a la enzima con NAD⁺ porque la solubilidad del NAD⁺ impidió usar las altas concentraciones que se requerían. A partir de estos resultados es claro, sin embargo, que la K_d para el NAD⁺ de la mutante G125K es muy superior a la de la enzima silvestre, que es $85 \pm 2 \mu\text{M}$. Los datos de la saturación con NADP⁺ pudieron ajustarse a la ecuación de una sigmoide (Ecuación 3 en Métodos), permitiendo estimar un valor de $L_{0.5}$ para este nucleótido de $379 \pm 63 \mu\text{M}$. Éste es un valor aproximadamente 8 veces mayor que el reportado para la enzima silvestre, $45 \mu\text{M} \pm 3$ (Velasco-García *et al.*, 2000), aunque no son comparables ya que la unión del nucleótido a la enzima silvestre es hiperbólica mientras que a la mutante se une en forma aparentemente cooperativa con un n_H de 1.67 ± 0.3 . Estos resultados confirman que el sitio de unión al nucleótido está muy alterado en la enzima mutante.

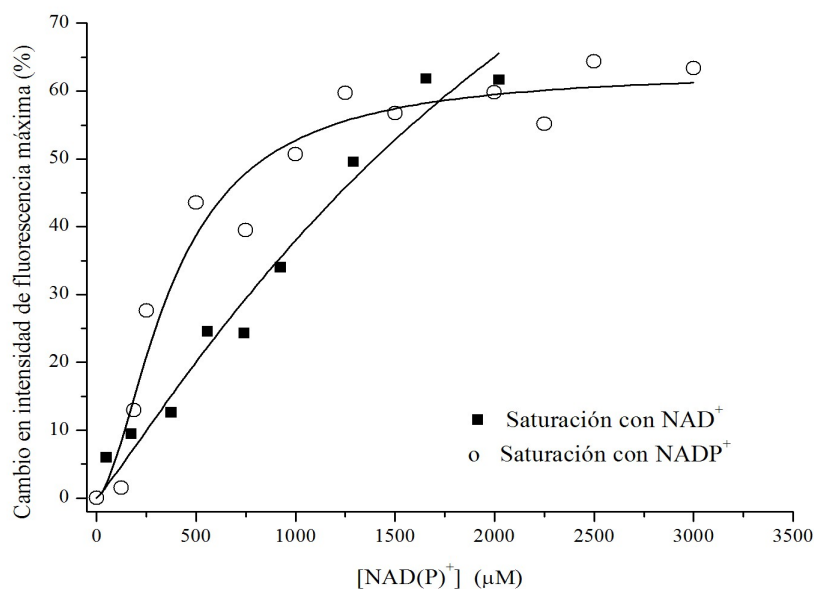


Figura 21. Unión del NAD(P)⁺ a la PaBADH G125K seguida por el apagamiento de la fluorescencia intrínseca como función de la concentración de NADP⁺ (○) o NAD⁺ (■). La concentración de enzima utilizada fue de 50 μgml⁻¹. La λ de emisión a la que se midió el cambio de intensidad de fluorescencia fue de 335 nm.

En el modelo obtenido de la enzima mutante (Fig. 22) no fue posible encontrar diferencias en el sitio de unión al nucleótido que nos diera información acerca del cambio conformacional ocurrido en la enzima que llevara a ésta a no unir de forma adecuada al nucleótido.

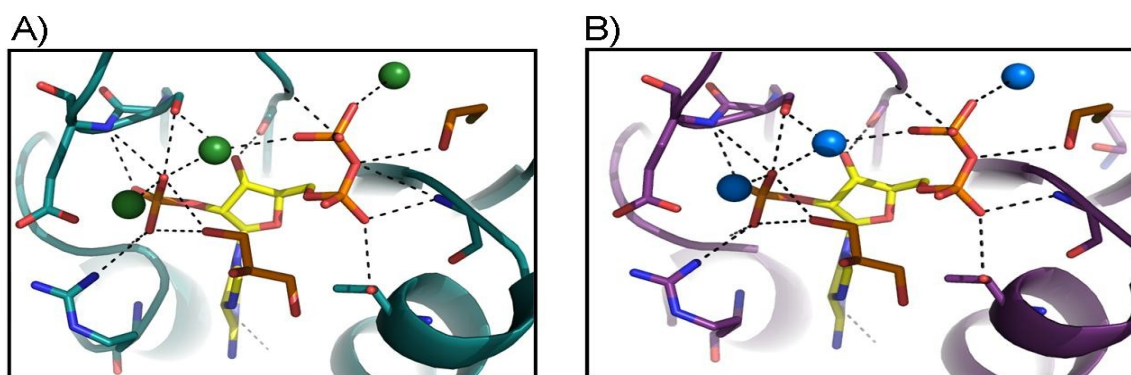


Figura 22. Representación del sitio de unión de la coenzima en la PaBADH silvestre (A) y en el modelo de la PaBADH G125K (B). No se observan cambios en las interacciones involucradas en el mantenimiento del NADP⁺.

VII.4 Caracterización estructural de la PaBADH G125K

VII.4.1 Estructura cuaternaria

Con el fin de evaluar el estado de agregación de la enzima mutante, ésta se sometió a cromatografía de exclusión molecular en una columna de Superdex G200. Cuando se comparan los perfiles de elución de la enzima mutante y la de la silvestre (Fig. 23), se encontró que no existen diferencias significativas entre los tiempos de elución de ambas muestras, 29.6 y 29.5 min para la enzima silvestre y la mutante, respectivamente. Ambos tiempos corresponden a la estructura tetrámerica de la enzima nativa de 213.2 kDa. Por tanto, la mutación G125K no altera el estado de oligomerización de la enzima, es decir, no produce la disociación del tetrámero ni forma agregados de mayor masa molecular a la concentración de proteína usada en este experimento (2 mg ml^{-1}).

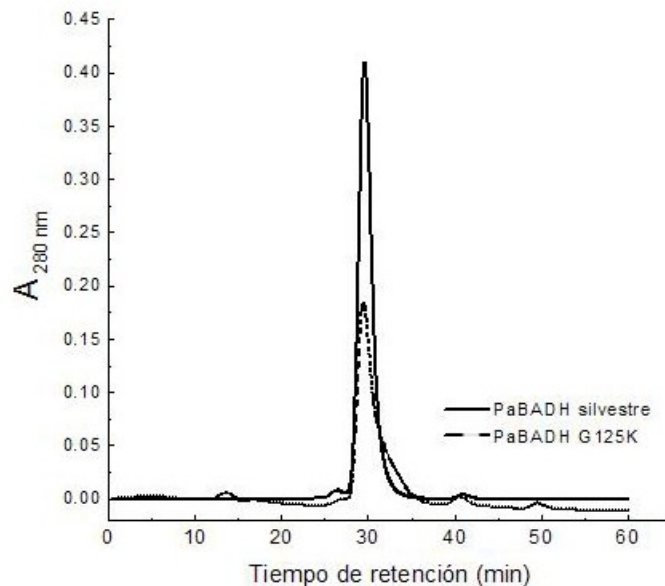


Figura 23. Perfiles de elución en cromatografía de exclusión molecular de la PaBADH silvestre (4 mg ml^{-1}) y la PaBADH G125K (2 mg ml^{-1}). El tiempo de retención de la enzima silvestre es de 29.6 min, y el de la mutante G125K es de 29.5 min.

VII.3.2 Estructura terciaria

La modificación de la estructura terciaria de la BADH G125K se evaluó por medio de ensayos de fluorescencia intrínseca de la proteína excitando a una longitud de onda 280 nm en la que absorben tanto la tirosinas como los triptofanos de la proteína. En la Fig. 24 se puede observar que no existen diferencias significativas entre la intensidad de emisión de fluorescencia de la BADH silvestre y de la mutante, si bien se observa un ligero corrimiento de la longitud de onda máxima de emisión (λ_{max}) de 2

nm hacia el rojo en el espectro de la G125K. Este corrimiento corresponde con un cambio en el CEM, que pasa de ser 335.8 nm en el espectro de la PaBADH silvestre a 339.6 nm en el de la mutante. Estos cambios en el espectro indican que la mutación afecta ligeramente el ambiente hidrofóbico de los residuos aromáticos. En la región del dominio de oligomerización de la enzima donde se localiza la mutación sólo hay una tirosina, en la posición 137, la que podría estar exponiéndose más al medio. Pero debido a lo pequeño de estos cambios se puede concluir que la mutación no parece tener efectos importantes sobre la estructura terciaria de la enzima.

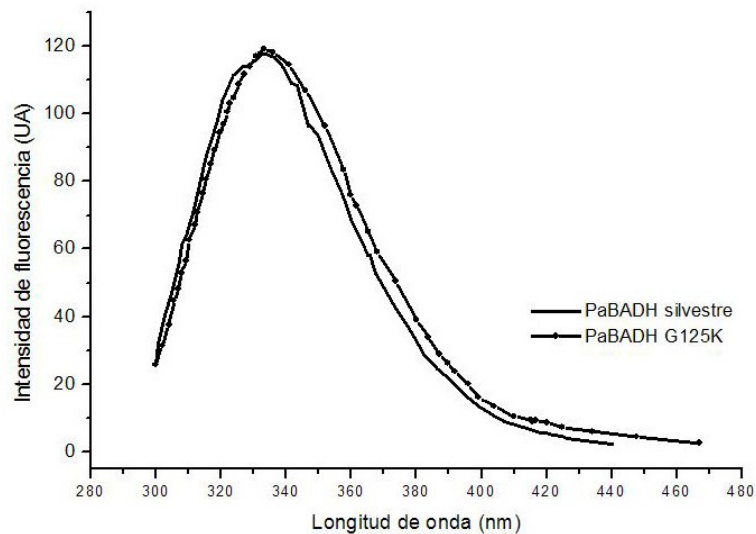


Figura 24. Espectro de emisión de fluorescencia intrínseca de la PaBADH silvestre y de la mutante G125K. La λ de excitación 280 nm. La concentración de proteína usada fue de $50 \mu\text{gml}^{-1}$ en los dos casos.

Los posibles cambios en la estructura terciaria también se exploraron mediante la fluorescencia extrínseca del ANS, un fluoróforo que se une a cavidades hidrofóbicas aumentando su fluorescencia, lo que nos permitiría conocer si la mutación causa la exposición de regiones hidrofóbicas de la proteína, aunque no se hubiese alterado su estructura cuaternaria ni el ambiente de los residuos aromáticos, se decidió utilizar la prueba del ANS. Los espectros de emisión de fluorescencia del ANS en presencia de la enzima silvestre o de la mutante mostrados en la Fig. 25 indican que la PaBADH aun en estado nativo tiene regiones hidrofóbicas expuestas, ya que une significativamente al ANS y que, contrariamente a lo que podría haberse esperado, la enzima mutante lo une menos, ya que presenta menor intensidad de emisión de fluorescencia que la silvestre. Sin embargo, sí se observó un ligero corrimiento hacia el rojo del CEM de la PaBADH G125K, cuyo CEM es de 496.6 nm, mientras que el

de la PaBADH silvestre es de 494.2 nm, lo que indica que la mutación sí produjo un cambio estructural que expuso las regiones hidrofóbicas a las que se une el ANS.

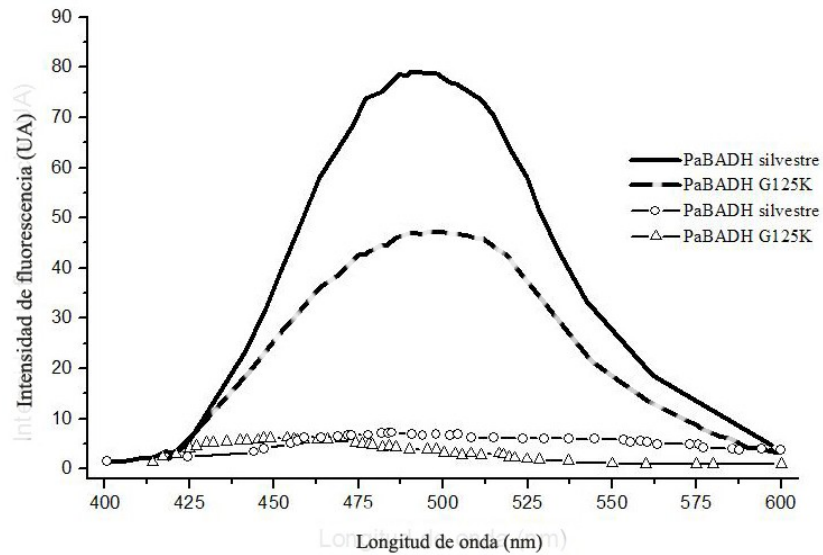


Figura 25. Espectros de emisión de fluorescencia del ANS en presencia de las enzimas PaBADH silvestre y la mutante G125K. En ambos casos se utilizó una concentración de enzima de $50 \mu\text{gml}^{-1}$. La λ de excitación fue de 370 nm. Las líneas con símbolos abiertos representan el espectro de emisión de ambas enzimas en ausencia de ANS excitando a 370 nm.

VII.4 Estructura secundaria

A la PaBADH G125K se le determinó su espectro de DC en el UV lejano con el fin de investigar si la mutación había producido un cambio en la estructura secundaria. La Fig. 26 muestra que no existen diferencias significativas entre los espectros de la enzima silvestre y mutante, lo que indica que a este nivel no se afectó la estructura de la proteína por el cambio de la G125 a lisina.

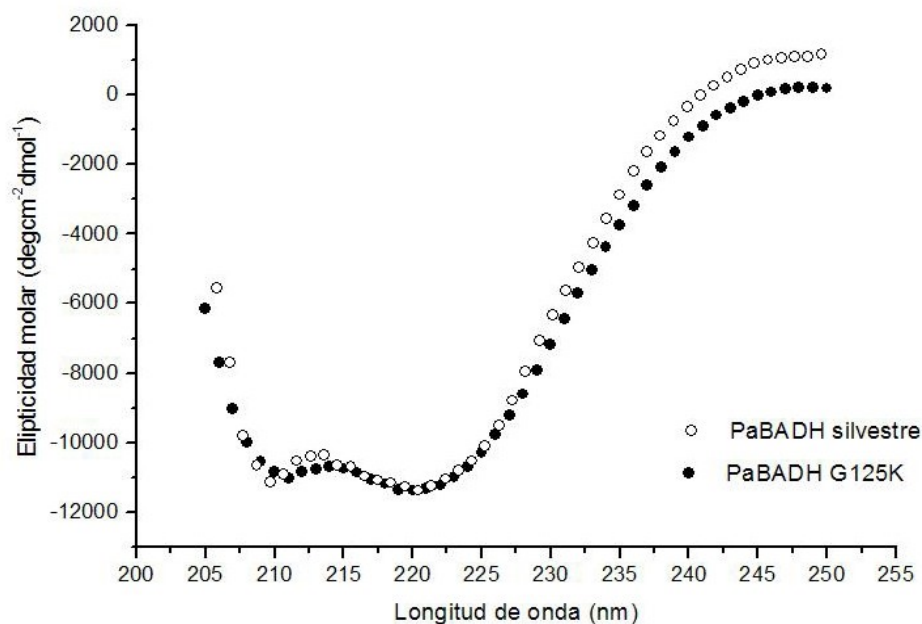


Figura 26. Espectros de DC en el UV lejano de la PaBADH silvestre y de la PaBADH G125K. La concentración de proteína utilizada en ambos casos fue de 250 μgml^{-1} .

VII.5 Estabilidad de la PaBADH G125K

VII.5.1 Estabilidad frente a la urea

La observación de que parte de la enzima mutante expresada en las células de *E. coli* se encontraba en cuerpos de inclusión indicaba que el cambio de la glicina por lisina afectó su estabilidad conformacional. Con el fin de investigar más a fondo este efecto, se estudió el comportamiento de la proteína PaBADH mutante ante la urea como agente desnaturizante y se comparó con el de la enzima silvestre, que no se conocía antes de realizar este estudio.

Una disolución de cualquiera de estas enzimas con una concentración de 50 μgml^{-1} se incubó a distintas concentraciones de urea y se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca a las 0 horas, es decir, en el momento en el que se adicionó la urea, y a las 12 hrs de incubación con urea. Como ejemplo, la Fig. 27 muestra los espectros obtenidos tras 12 hrs de incubación.

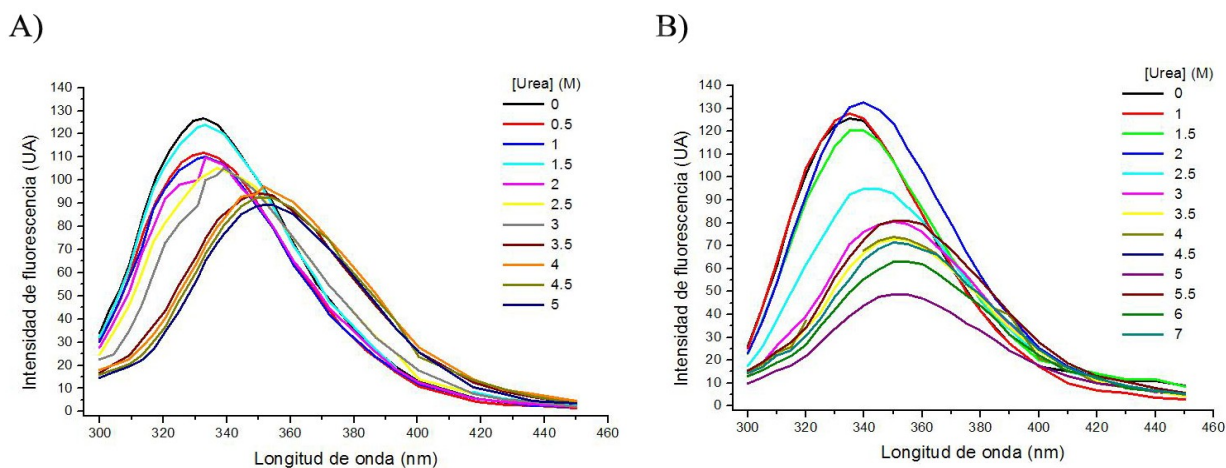


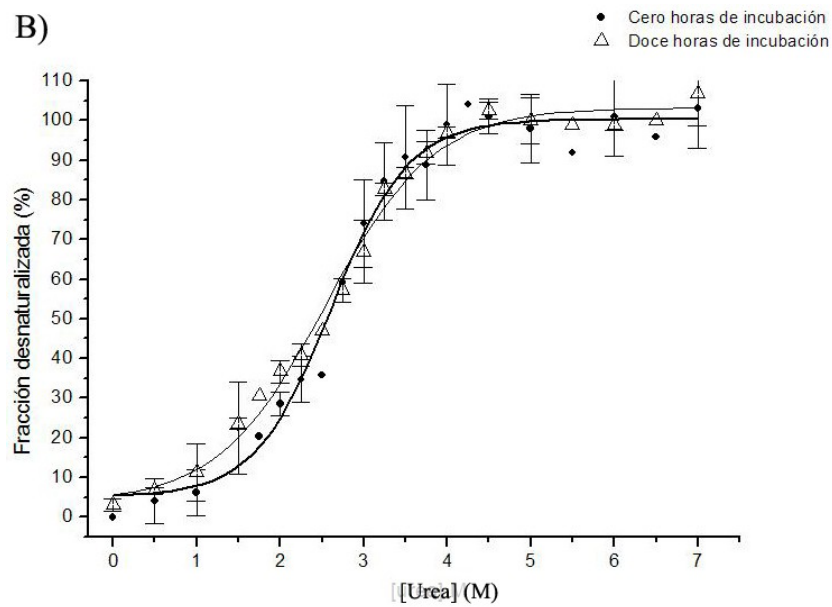
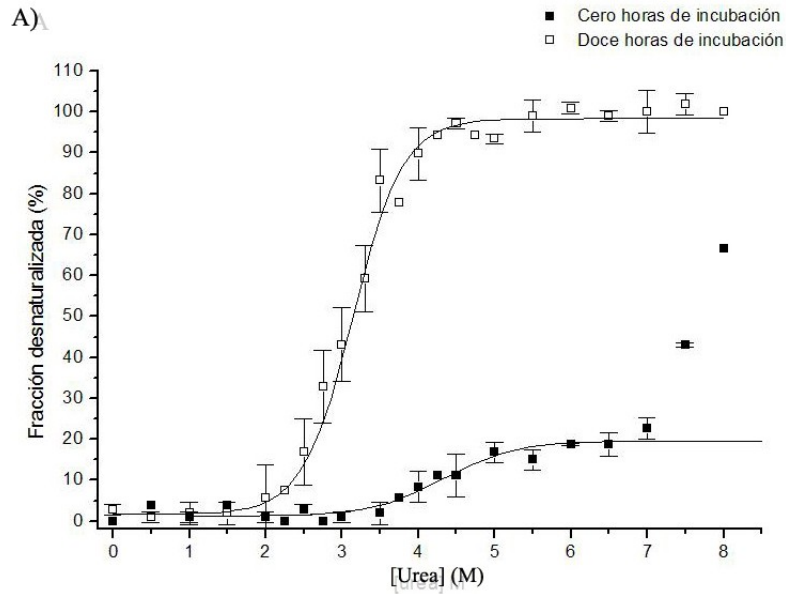
Figura 27. Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de la PaBADH silvestre (A) y PaBADH G125K (B) a las doce horas de incubación con distintas concentraciones de urea. La concentración de ambas enzimas fue de $50 \mu\text{gml}^{-1}$. La λ de excitación fue de 280 nm.

Los espectros de fluorescencia de ambas enzimas no cambiaron después de 12 hrs de incubación con las diferentes concentraciones de urea (resultados no mostrados) lo que indica que este tiempo es suficiente para alcanzar el equilibrio entre las especies desnaturada y nativa de estas proteínas. De hecho, con la enzima mutante el equilibrio se alcanza casi inmediatamente después de que se añade la urea, como puede observarse por la casi coincidencia de las curvas de desnaturación a las cero y doce horas (Fig. 28B).

Se determinó la fracción de enzima desnaturada, como se describe en Métodos (Ecuación 6), y se obtuvieron de esta forma las curvas de desnaturación a los diferentes tiempos de incubación con urea. Los datos obtenidos con ambas proteínas se pudieron ajustar a una función sigmoideal (la ecuación de Boltzman, Ecuación 7 en Métodos), que aplica para un modelo de dos estados, obteniéndose los parámetros mostrados en la Tabla 1. La Fig. 28C muestra en forma comparativa las curvas de desnaturación de ambas enzimas a las 12 hrs de incubación. Al tiempo cero la curva de desnaturación de la PaBADH silvestre claramente presenta dos fases, indicativas de la presencia de un intermediario que es relativamente estable en el intervalo de concentración de urea de entre 2 y 7 M. No se determinó durante cuánto tiempo existe este intermediario, que ya no es observable cuando se alcanza el equilibrio a las 12 hrs. La primera de estas fases se pudo ajustar a una ecuación de Boltzman, pero no se logró el ajuste de la segunda fase dada la escasez de datos y el que esta transición parece no haber concluido a la máxima concentración de urea utilizada.

La enzima mutada presentó un menor valor de C_m , que es la concentración de urea necesaria

para obtener el 50 % de enzima desnaturalizada, y una menor cooperatividad del proceso de desnaturalización, indicado por un valor mayor del parámetro m de la ecuación de Boltzman, que la silvestre. Ambos resultados indican que la mutante es menos estable ante la urea que la silvestre.



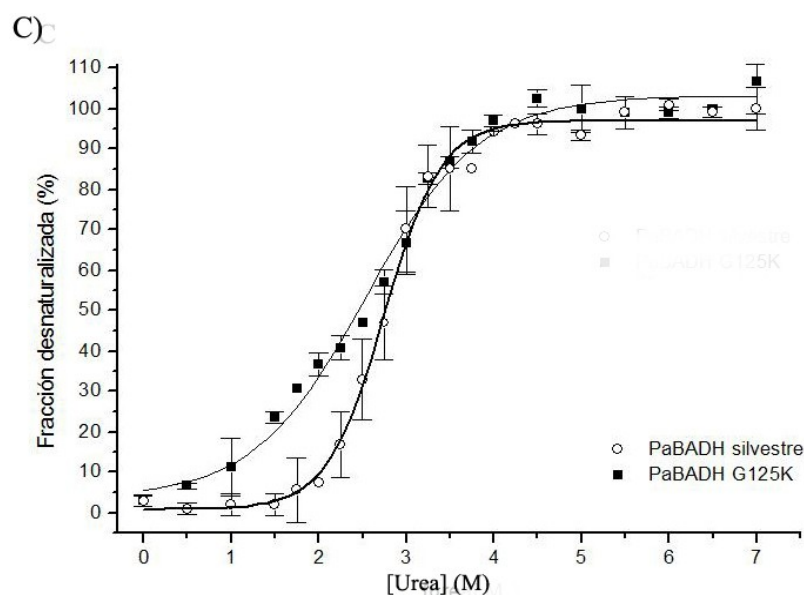


Figura 28. Curvas de desnaturalización por urea de la PaBADH silvestre (A) y de la mutante G125K (B). Se utilizó en ambos casos una concentración de enzima de $50 \mu\text{gml}^{-1}$. Para facilitar la comparación entre ambas enzimas, en el panel (C) se muestran las curvas de desnaturalización de la PaBADH silvestre (○) y de la PaBADH G125K (■) a las doce horas de incubación. Se obtuvo el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca y se registró el λ de la máxima intensidad de emisión. Los resultados son el promedio de dos repeticiones y se expresan como porcentaje de la fracción de proteína desnaturalizada, con la desviación estándar de los datos mostrada como barras. Las líneas son teóricas, obtenidas del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Boltzman (Ecuación 7 en Métodos).

Tabla 1. Parámetros¹ de desnaturalización por urea de las PaBADH silvestre y G125K

Tiempo de incubación (h)	A_1	A_2	2C_m (M)	m
PaBADH silvestre				
³ 0	1.17 ± 0.73	19.58 ± 1.19	4.33 ± 0.13	0.47 ± 0.13
12	0.89 ± 1.41	98.1 ± 0.95	3.02 ± 0.03	0.34 ± 0.02
PaBADH G125K				
0	3.63 ± 3.00	103.19 ± 1.66	2.54 ± 0.06	0.64 ± 0.06
12	5.10 ± 3.29	100.32 ± 2.07	2.61 ± 0.07	0.46 ± 0.08

¹Los parámetros se obtuvieron por ajuste del porcentaje de fracción desnaturalizada a la ecuación de Boltzman 2C_m es la concentración de urea que produce 50% de proteína desnaturalizada. ³Parámetros aparentes obtenidos del ajuste de los datos de la primera fase de desnaturalización.

VII.5.2 Estabilidad frente a la temperatura

La estabilidad térmica de las enzimas silvestre y la mutante G125K de la PaBADH se siguió midiendo el cambio de elipticidad a 222 nm al incrementar la temperatura, lo que nos muestra los cambios que las proteínas sufren en su estructura secundaria (Fig. 29). El proceso de desnaturalización térmica de ambas proteínas presenta dos transiciones, que pueden ajustarse a una ecuación doble de Boltzman (ecuación 8 en Métodos). La Tabla 2 muestra los resultados de este ajuste. Como puede apreciarse, para la primera transición el valor de T_{m1} de la enzima silvestre es 2 °C mayor que el valor que presenta la mutante, y para la segunda transición el valor de T_{m2} es 5.2 °C mayor en la silvestre. En la Fig 29, se observa que la segunda transición empieza antes en la PaBADH G125K. Puesto que es posible que esta segunda transición se deba a la precipitación de la enzima, este resultado indicaría que la enzima mutante es más susceptible a la agregación causada por calentamiento que la enzima silvestre.

Después del calentamiento, tanto la PaBADH silvestre como la PaBADH G125K forman agregados visibles e insolubles que precipitan, por lo que no es posible saber si la aparente total desnaturalización se debe a la pérdida total de estructura secundaria o es resultado de la precipitación de la proteína. Debido a esta agregación la desnaturalización térmica es irreversible y por tanto los parámetros obtenidos en el ajuste son aparentes.

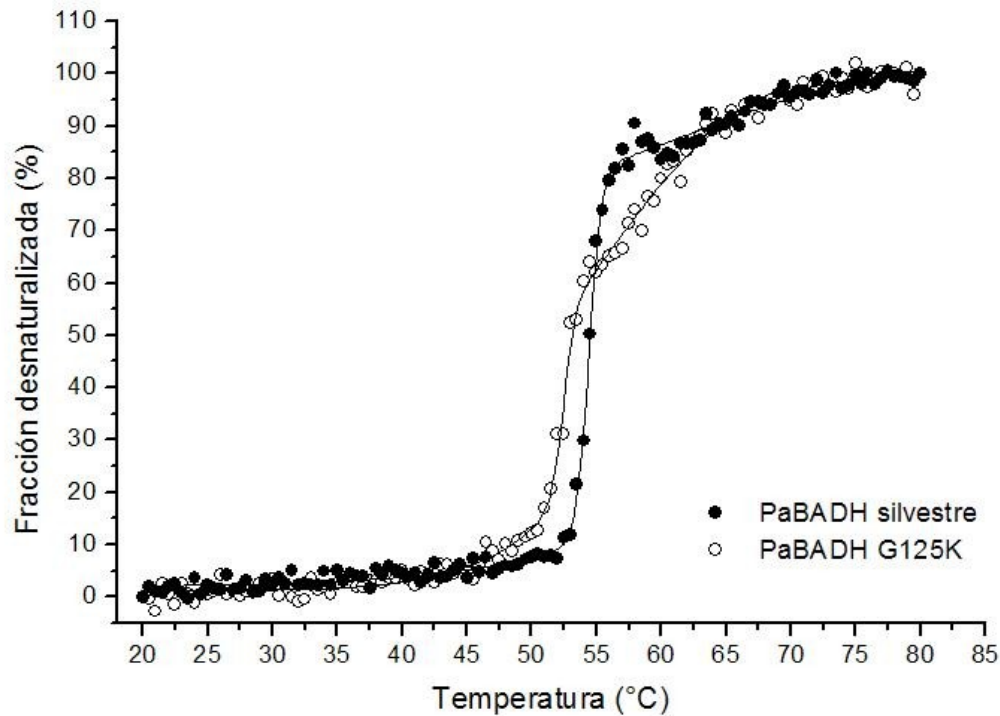


Figura 29. Curva de desnaturalización térmica de las enzimas PaBADH silvestre (○) y G125K (●) siguiendo el cambio de elipticidad molar a 222 nm. Se utilizó una concentración de proteína de 0.25

mgml⁻¹ para ambos casos. Las líneas son teóricas, obtenidas del mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación doble de Boltzman (Ecuación 8 en métodos).

Tabla 2. Parámetros obtenidos del ajuste de los datos de desnaturalización térmica de las enzimas PaBADH silvestre y G125K a la Ecuación 8 descrita en la sección de Métodos.

A_2	T_{m1} (°C)	m_1	A_3	A_4	T_{m2} (°C)	m_2
PaBADH silvestre						
71.26 ± 1.17	54.39 ± 0.03	0.48 ± 0.03	73.21 ± 1.20	103.55 ± 1.45	62.15 ± 1.24	8.00 ± 0.74
PaBADH G125K						
36.62 ± 1.95	52.47 ± 0.07	0.46 ± 0.07	37.73 ± 2.01	100.05 ± 0.54	56.89 ± 0.29	4.69 ± 0.17

VIII. DISCUSIÓN

En esta tesis se investigó un posible determinante estructural del estado de asociación de una ALDH tetramérica, la PaBADH, y el efecto que esta asociación puede tener sobre la función de la enzima, usando el modelaje estructural de proteínas, la mutagénesis sitio-dirigida, estudios cinéticos y de unión de la coenzima y estudios de estabilidad frente a condiciones desnaturalizantes (altas concentraciones de urea y altas temperaturas).

Se pensó que la existencia conservada de una glicina, que ocupa la posición 125 en la PaBADH, en la intercara dímero-dímero de las BADHs tetraméricas permitía que se aproximaran lo suficiente los dímeros para formar el tetrámero. Se decidió cambiar este residuo para evaluar su papel en la formación de tetrámeros. No creíamos que su mutación afectaría la formación de dímeros, ni el plegamiento del monómero, puesto que el residuo equivalente en las enzimas BADH diméricas tiene su cadena lateral expuesta al solvente. El residuo elegido para hacer la mutación fue una lisina, ya que éste es un aminoácido frecuente en la posición equivalente en la BADHs diméricas (Julián-Sánchez *et al.*, 2007). Al ser la lisina uno de los aminoácidos más voluminosos y con carga positiva a pH fisiológico, esperábamos no sólo que se orientara hacía afuera de la subunidad sino que además la repulsión entre las cadenas laterales de los dos residuos en subunidades enfrentadas impidiera que los dímeros se aproximaran para formar el tetrámero. Éste sería el primer estudio en el que se explorara la participación de un único residuo en la formación de la formación de tetrameros en aquellas ALDHs en las que ésta es la forma nativa. En el pasado se ha encontrado que las diferencias entre las formas tetraméricas y diméricas de las ALDHs consisten fundamentalmente en que las primeras poseen una mayor superficie hidrofóbica en la región de la intercara dímero-dímero en las primeras (Rodríguez-Zavala y Weiner, 2002). De obtenerse un dímero, ésta sería la primera ocasión que una enzima ALDH tetramérica hubiera sido convertida en una dimérica sin alterar la intercara monómero-monómero, lo que permitiría investigar las consecuencias que este cambio en el estado de asociación tendría sobre la función y la estabilidad de la enzima. En nuestro laboratorio se habían obtenido monómeros inactivos por disociación de la PaBADH en condiciones de baja fuerza iónica (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003), o por modificación química de la cisteína catalítica con un reactivo voluminoso (Velasco-García *et al.*, 2006b), pero no se habían obtenido dímeros bajo ninguno de estos tratamientos. Si habíamos obtenido dímeros al mutar la C439, un residuo que se encuentra en la intercara monómero-monómero de una

subunidad dimérica (González-Segura *et al.*, 2005). La mutante C439V se disocia en dímeros estables en condiciones de baja fuerza iónica, pero estos dímeros son inactivos probablemente debido a la reorganización estructural que conlleva la mutación en la región inter-monómero. En otras palabras, los dímeros obtenidos con la mutante C439V no pueden considerarse “nativos”, mientras que esperábamos que los obtenidos por la mutación de G125 conservaran la estructura nativa que tienen en el tetrámero.

El primer efecto observable de la mutación realizada fue sobre la expresión de la proteína; una buena proporción de ésta se obtuvo de forma insoluble, en el precipitado del extracto libre de células después de la rotura por ultrasonido y centrifugación de células de *E. coli* siguiendo el protocolo usado para expresar a la PaBADH silvestre. Ello era una indicación de que la enzima mutante o es más inestable, o de que se afecta algún paso de la ruta de plegamiento de forma que se favorece una ruta equivocada que lleva a la agregación. Esto podría ser el resultado de que los dímeros que pensamos deberían formarse en la mutante fuesen inestables, o que al no interactuar correctamente unos con otros expusieran un área hidrofóbica, que en forma inespecífica llevaría a la formación de agregados insolubles. Sin embargo, esta mutación no afectó el estado de oligomerización de la enzima, que cuando se expresa en forma soluble sigue siendo tetramérica. Este resultado es consistente con la predicción de la mutación *in silico*, que arrojó un modelo en el que la cadena lateral de la lisina se entierra en su propia subunidad, principalmente debido al tipo de interacciones que hace con otras cadenas laterales o grupos polares del esqueleto de la cadena polipeptídica, no estorbando para que los dímeros se aproximen y establezcan las interacciones necesarias para formar el tetrámero.

Para obtener completamente pura la enzima G125K fue necesario utilizar un paso más de cromatografía, de intercambio iónico, ya que esta mutante no se unió a la columna de afinidad con la que se logra la purificación a homogeneidad de la enzima silvestre. Este hallazgo indicó que la mutante no unía al nucleótido, o lo hacía con muy baja afinidad. Efectivamente comprobamos que su afinidad por el NAD⁺ es menor que la que presenta la enzima silvestre, mientras que la afinidad por el NADP⁺ también es menor, y además lo une de forma cooperativa. El residuo cambiado está lejos del sitio activo y examinando la estructura tridimensional de la enzima silvestre o el modelo obtenido para la enzima mutante, no es claro cuál es la ruta por la que esta intercara se comunica con el sitio de unión del nucleótido, ni como se genera un camino de comunicación entre las subunidades que hacen que en la mutante la unión del nucleótido, al menos del NADP⁺, sea cooperativa. La cooperatividad positiva de unión del nucleótido ya había sido observada en otras ALDHs tetraméricas en las que se han mutado residuos situados en las intercara (Wei *et al.*, 2000; Wei y Weiner, 2001). Nuestros resultados con la

mutante G125K apoyan la idea de que las ALDHs poseen una cooperatividad “oculta” que es fácil sacar a la luz por mutaciones en la región intersubunidad.

La enzima G125K no presentó actividad BADH incluso a concentraciones de nucleótido en que éste debe unirse, lo que indica que no sólo se afecta la afinidad sino que la unión ocurre en una forma no apropiada para que se dé la reacción de óxido-reducción. Por tanto, la mutación en un residuo alejado del sitio activo altera seriamente la estructura de éste, lo que no fue observado en el modelo de la mutante por lo que tal vez sea necesario usar métodos de dinámica molecular.

Como hemos mencionado, la mutación no afectó el estado de oligomerización de la enzima y, a juzgar por los estudios de fluorescencia intrínseca y dicroísmo circular, tampoco afectó significativamente ni la estructura terciaria ni la estructura secundaria. En los estudios de estabilidad ante la desnaturalización por urea, se encontró que la PaBADH G125K es menos estable, lo que se muestra no sólo en los estudios realizados cuando se alcanza el equilibrio sino sobre todo en la cinética de desnaturalización. Al tiempo cero de incubación, es decir al momento de añadir la urea, la proteína G125K ha alcanzado prácticamente el equilibrio entre la desnaturalizada y la que permanece nativa, mientras que la PaBADH silvestre presenta un intermediario que es estable hasta una concentración de 7 M de urea. Nuestros resultados indican que la enzima mutante en su estado nativo es menos estable que la silvestre, por lo que aun cuando el estado de transición sea el mismo para ambas enzimas, la energía de activación será menor en la primera y alcanzará el estado desnaturalizado más rápidamente (Figs. 30 A y B). Por otra parte, los datos experimentales son consistentes con que el proceso de desnaturalización por urea de ambas enzimas es de dos estados, y experimentos de filtración en gel tras la incubación con urea (no mostrados) indicaron que la PaBADH silvestre es aún tetramérica a concentraciones de urea hasta 6 M. Esto parece indicar que el desplegamiento de esta enzima, o pérdida de estructura terciaria, ocurre antes que la pérdida de estructura cuaternaria. Sin embargo, no sabemos si esto es también cierto para la enzima mutante, ya que no se realizaron con ella los experimentos de filtración en gel. Por ello, otra posible explicación, que es necesario probar, es que aunque la mutación no logró cambiar el estado tetramérico de la enzima, si debilitó las interacciones entre las subunidades de la proteína de manera que el proceso de la desnaturalización inducida por urea de la enzima mutante no sea el mismo que el de la enzima silvestre y que en la ruta de desplegamiento de la mutante exista un intermediario, que puede ser la proteína disociada. Es decir, es posible que la mutante se disocie antes de desplegarse y que tanto este paso de disociación como el paso de desplegamiento de la enzima disociada tengan una energía de activación muy pequeña, lo que en conjunto llevaría a que la

desnaturalización de la enzima mutante ocurra muy rápidamente aún a bajas concentraciones de urea (Fig. 30C). Los datos experimentales son consistentes con que el proceso de desnaturalización por urea de ambas enzimas es de dos estados, pero pudiera ser que en la mutante el paso del intermediario disociado al estado totalmente desplegado sea tan rápido que este intermediario no se acumule significativamente.

Figura 30. Diagramas de energía de los estados nativos (N) y desnaturalizado (D) de la PaBADH silvestre (A) y de la mutante G125K (B) a concentración cero de urea, propuestos en base a los datos experimentales asumiendo un modelo de dos estados. Se propone que el estado de transición (X^\ddagger) es de igual energía para el caso de la PaBADH silvestre y de la mutante, mientras que el estado nativo (N) para el caso de la mutante es menos estable, por lo que es más fácil alcanzar el estado desnaturalizado (D) al incubar con urea. (C) Energía de los estados nativos (N), intermediario (I) y desnaturalizado (D) de la PaBADH G125K asumiendo un proceso de tres estados. Posiblemente el intermediario sea la enzima disociada. Los pasos del estado desnaturalizado al nativo se indican con flechas discontinuas puesto que aún no conocemos si la desnaturalización es o no reversible.

Será interesante investigar en estudios futuros si la mutante se disocia rápidamente en dímeros y/o monómeros aun a concentraciones bajas de urea y si éste paso de disociación es previo a la pérdida de estructura terciaria y secundaria. También será necesario estudiar si el proceso de desnaturalización por urea es reversible. Esta reversibilidad dependerá de la magnitud de la barrera energética que el estado desnaturalizado tenga que superar en su camino hacia el estado nativo; es decir, del ΔG de transición del paso $D \rightarrow N$ (o de los dos pasos $D \rightarrow I$ y de $I \rightarrow N$, en el caso de la mutante).

El estudio de la mutante G125K reafirma la importancia de las regiones intercara de las proteínas oligoméricas no sólo para su estabilidad sino también para su función, y, junto con el ya mencionado en el que se obtuvo la mutante C439V, abre un camino para explorar cómo cambios en la región intercara dímero-dímero o en la de la intercara monómero-monómero afectan la estructura del sitio activo.

IX. CONCLUSIONES

La mutación del residuo de glicina en la posición 125 de la PaBADH tuvo consecuencias estructurales y funcionales no anticipadas por su posición en la estructura tridimensional de la enzima:

1. La mutación no produjo el cambio en el estado tetramérico esperado, aunque sí disminuyó la estabilidad conformacional de la proteína.
2. El efecto más importante de esta mutación fue sobre la actividad de la enzima, que se perdió totalmente como consecuencia de la mutación, lo que indica que aunque el residuo mutado está lejos del sitio activo, la estructura de éste, particularmente de la región que une al nucleótido, se afectó seriamente.
3. La falta de actividad de la enzima mutante probablemente no sólo se debe a que une muy pobremente al nucleótido oxidado, sino que una vez que lo une lo hace en una posición incorrecta para que se produzca la transferencia del hidruro requerida en la oxidación del sustrato aldehído, o bien el sitio activo tiene una conformación alterada que evita que se dé la transferencia del hidruro.
4. Una vez que el nucleótido se une a un sitio activo de la enzima mutante promueve la reestructuración de la proteína facilitando la unión del nucleótido a otros sitios activos.

X. PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos en el estudio aquí reportado han surgido una gran cantidad de preguntas que para ser contestadas requieren de lo siguiente:

- Investigar si la PaBADH G125K posee actividad cuando se ensaya a muy altas concentraciones

de NAD(P)⁺.

- Investigar si en la mutante G125K también está afectada la unión de los mononucleótidos de adenina, AMP o ADP, y/o de nicotinamida (NMN o NMNH).
- Realizar estudios de dinámica molecular para obtener modelos más confiables de la mutante G125K que permitan inferir los cambios en el sitio activo.
- Determinar la estructura cristalográfica de la mutante para entender:
 - α) Cuál es la organización estructural del sitio activo en la enzima mutante.
 - β) Cómo los cambios en la intercara dímero-dímero se transmiten a otras regiones de la proteína, concretamente al sitio activo.
 - χ) Cómo se une el nucleótido en esta enzima.
 - δ) Las bases estructurales de la cooperatividad positiva de unión del nucleótido que se observa en la mutante.
- Completar los estudios de desnaturalización por urea tanto de la enzima silvestre como de la mutante investigando:
 - a) Si esta desnaturalización es reversible y en caso de que lo fuese y de serlo calcular los parámetros termodinámicos correspondientes y estudiar el proceso de renaturalización.
 - b) Los cambios en actividad enzimática de la enzima silvestre producidos por la incubación con urea.
 - c) Los efectos de la incubación con urea sobre el estado de asociación de las proteínas silvestre y G125K.
 - d) El efecto de la concentración de proteína sobre la desnaturalización por urea.
 - e) El efecto del sustrato aldehído y de los coenzimas reducidos y oxidados, NAD(P)⁺ y NAD(P)H sobre el proceso de desnaturalización.
 - f) El efecto del catión K⁺ y de la fuerza iónica sobre el proceso de desnaturalización.
- Generar mutantes en esta posición cambiando la glicina por aquél o aquellos aminoácidos que una mutación *in silico* prediga que pueden evitar la asociación de los dímeros para formar el

tetrámero nativo. De lograrse, caracterizar funcional y estructuralmente los dímeros que se obtengan.

- Investigar por medio de estudios filogenéticos cuál fue el estado de oligomerización de las ALDHs primitivas.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Ambroziak, W. y Pietruszko, R. 1991. Human aldehyde dehydrogenase. Activity with aldehyde metabolites or monoamine, diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* 266: 13011-13018.
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T. y Akazawa, T. 1987. Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* 101: 1485-1488.
- Bartels, D. 2001. Targeting detoxification pathways: an efficient approach to obtain plants with multiple stress tolerance?. *Trends Plant Sci.* 7: 284-286.
- Bergen, G.A. y Shelhamer, J.H. 1996. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 10: 297-325.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S. y Bremer, E. 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* 168: 282-289.
- Chern, M.K. y Pietruszko, R. 1995. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213: 561-568.
- DeLano, W.L. 2002. The Pymol Molecular Graphics System DeLano Scientific, San Carlos, CA en: <http://www.pymol.org>.
- Diab, F., Bernard, T., Bazire, A., Haras, D., Blanco, C. y Jebbar, D. 2006. Succinate-mediated catabolite repression control on the production of glycine betaine catabolic enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 under low and elevated salinities. *Microbiology.* 152: 1395-1406.
- Díaz-Sánchez, A.G., González-Segura, L., Rudiño-Piñera, E., Lira-Rocha A. y Muñoz-Clares R.A. A novel cysteine-NADPH covalent adduct in *Pseudomonas aeruginosa* BADH suggests important roles of the reduced nucleotide in the reaction mechanism. Sometido.
- D'Souza-Ault, M., Smith, L.T. y Smith G.M. 1993. Roles of N-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 473-478.
- Dragolovich, J. y Pierce, S.K. 1994. Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *J. Exp. Biol.* 270: 417-425.

- Falkenberg, P. y Strom A.R. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1034: 253-259.
- Fitzgerald, T.L., Waters, D.L. y Henry, R.J. 2008. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. *Plant Biol.* 11: 119-130.
- Fujiwara, T., Hori, K., Ozaki, K., Yokota, Y., Mitsuya, S., Ichiyanagi, T., Hattori, T. y Takabe, T. 2008. Enzymatic characterization of peroxisomal and cytosolic betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Physiol. Plant.* 13: 22–30.
- Garza-Ramos, G., Carrillo-Nava, E., Costas, M., Mújica-Jímenez, C., Velasco-García, R. y Muñoz-Clares, R.A. En: H. Weiner, E. Maser, R. Lindahl, B. Plapp (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 13*, Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, USA, 2007, pp. 83-90.
- George, R.H. 1987. *Pseudomonas* infection in cystic fibrosis. *Arch. Dis. Child.* 62: 438-439.
- Gill, S.C. y von Hippel, P.H. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182: 319–326.
- González-Segura, L., Velasco-García, R., Rudiño-Piñera, E., Mújica-Jímenez, C. y Muñoz-Clares, R.A. 2005. Site-directed mutagenesis and homology modeling indicate an important role of cysteine 439 in the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie.* 87: 1056-1064.
- González-Segura, L., Rudiño-Pinera E., Muñoz-Clares R.A. y Horjales E. 2009. Cristal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism an shows a novel binding mode of the phosphate of NADP⁺ an a novel cation binding site. *J. Mol. Biol.* 385: 542-557.
- Govan, J.R. y Deretic, V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60: 539-574.
- Guzmán-Partida, A.M. y Valenzuela-Soto, E.M. 1998. Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 119: 485-491.
- Grunewald, R.W. y Eckstein, A. 1995. Osmotic regulation of the betaine metabolism in immortalized renal cells. *Kidney Int.* 48: 1714-1720.

- Hardalo, C. y Edberg, S. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23: 1, 47–75
- Hempel, J., Bühler, R., Kaiser, R., Holmquist, B., de Zalenski, C., von Wartburg, J.P., Vallee, B. y Jörnvall, H. 1984. Human liver alcohol dehydrogenase. The primary structure of the beta 1 isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 145 3: 437–445.
- Hibino, T., Meng, Y.L., Kawamitsu, Y., Uehara, N., Matsuda, N., Tanaka, Y., Ishikawa, H., Baba, S., Takabe, T., Wada, K., Ishii, T. y Takabe, T. 2001. Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine aldehyde dehydrogenase in betaine betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina*. *Plant. Mol. Biol.* 45: 353-363.
- HyperChem (TM) Professional 7.51, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA
- Hjelmqvist, L., Norin, A., El-Ahmad, M., Griffiths, W. y Jörnvall H. 2003. Distinct but parallel evolutionary patterns between alcohol and aldehyde dehydrogenases: addition of fish/human betaine aldehyde dehydrogenase divergence. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2009-2016.
- Holloway, W. 1955. Genetic recombination in *Pseudomonas aeruginosa* *J. Gen. Microbiol.* 13: 572-581.
- Horecker, B.L. y Kornberg, A. 1948. The extinction coefficients of the reduced band of the pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175: 385–390.
- Incharoensakdi, A., Matsuda, N., Hibino, T., Meng, Y.L., Ishikawa, H., Hara, A., Funaguma, T., Takabe, T. y Takabe, T. 2000. Overproduction of spinach betaine aldehyde dehydrogenase in *Escherichia coli*. Structural and functional properties of wild-type, mutants and *E. coli* enzymes. *Eur. J. Biochem.* 267; 7015-7023.
- Jakoby, W.B. 1963. Aldehyde dehydrogenases. En *The Enzymes*, 2nd edn, vol. 7. P.D. Boyer, H. Lardy y K. Myrback. (Eds) New York: Academic Press. pp. 203-221
- Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswawamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H. y Eklund, H. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Prot. Sci.* 7: 2106-2117.
- Julián-Sánchez, A., Riveros-Rosas, H., Martínez-Castilla, L.P., Velasco-García, R. y Muñoz-Clares, R.A.: Phylogenetic and structural relationships of the betaine aldehyde dehydrogenases. En: Weiner, H., Maser, E., Lindahl, R. y Plapp, B. (Eds.), *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism*. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, 2007. pp 64-76.
- Kurys, G., Ambroziak, W. y Pietruszko, R. 1989. Human aldehyde dehydrogenase. Purification and

characterization of a third isozyme with low K_m for γ aminobutyraldehyde. *J. Biol. Chem.* 264: 4715-4721.

Lakowics, J.R. 1983. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York. p. 44

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.

Lamark, T., Kaasen, E.M., Eshoo, W., Falkenberg, P., McDougall, J. y Strøm, 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.

Lessie, T.G. y Phibbs, P.V. Jr. 1984. Alternative pathways of carbohydrate utilization in *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 359-387.

Lindahl, E., Hess, B., van der Spoel, D. Gromacs 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *J. Mol. Mod.* 7:306–317, 2001.

Lindahl, R. y Hempel, J. 1991. Aldehyde dehydrogenase: What can be learned from a baker's dozen sequences? *Adv. Exp. Med. Biol.* 284: 1-8.

Liu, Z., Sun, Y.J., Rose, J., Chung, Y., Hsiao, C.D., Chang, W.R., Ingrid, K., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. y Wang, B.C. 1997. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interaction between NAD^+ and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* 4: 317-326.

Livingstone, J.R., Maruo, T., Yoshida, I., Tarui, Y., Hirooka, K. y Yamamoto, Y. 2003. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *J. Plant. Res.* 116: 133–140.

Lucchesi, G.I., Lisa, T.A., Casale, C.H. y Domenech, C.E. 1995. Carnitine resembles choline in the induction of cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C and in its action as an osmoprotectant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr. Microbiol.* 30; 55–60.

Lucchesi, G., Pallotti, C., Lisa, A. y Domenech, C. 1998. Constitutive choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 123-126.

Macnab, R.M. Flagella and motility, En Neidhart, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C., Low, K.B., Magasanik, B. Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M. y Umberger, H.E. (Eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Vol. I. Second edition. American Society for Microbiology, Washington D.C., U.S.A. 1996. pp. 123-145.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1997. Brock Biology of Microorganisms, 8a edición. Prentice Hall. New Jersey. pp. 698-701

- Meskys, R., Harris, R.J., Casate, V., Basran, J. y Scruton N.S. 2001. Organization of the genes involved in dimethylglycine and sarcosine degradation in *Arthrobacter* spp. Implications for glycine betaine catabolism. *Eur. J. Biochem.* 268: 3390-3398.
- Microcal Origin. Version 5.0. Microcal Software, Northampton, MA, USA
- 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.
- Mori, N., Fuchigami, S. y Kitamoto, Y. 2002. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 130-135.
- Muntz, J.A. 1950. The inability of choline to transfer a methyl group directly to homocysteine for methionine formation. *J. Biol. Chem.* 182: 489-499.
- Muñoz-Clares, R.A. y Valenzuela-Soto E.M. En: García-Hernández, E. y Fernández Velasco, A. (Eds.), *Advances in Protein Physical Chemistry*, Transworld Research Network, Kerala, India, 2008, pp. 279-302.
- Muñoz-Clares, R.A., Díaz-Sánchez, A. G., González-Segura, L. y Montiel C. 2010. Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: mechanistic and regulatory implications. *Arch. Biochem. Biophys.* 493: 71-81.
- Nagasawa, T., Kawabata, Y. y Ogata, K. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Agric. Biol. Chem.* 40: 1743-1749.
- Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K. y Takabe, T. 1997. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycine betaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. *Plant J.* 11: 1115-1120.
- Nakamura, T., Nomura M., Mori H., Jagendorf A.T., Ueda, A. y Takabe, T. 2001. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol.* 42: 1088-1092.
- Oishi, H., y Ebina, M. 2005. Isolation of cDNA and enzymatic properties of betaine aldehyde

- dehydrogenase from *Zoysia tenuifolia*. *J. Plant Physiol.* 162: 1077-1086.
- Pesin, S.R. y Candia, O.A. 1982. Achetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22: 651-659.
- Pietruszko R. y Chern M. 2001. Betaine aldehyde dehydrogenase from rat liver mitochondrial matrix. *Chem.-Biol. Interact.* 193: 130-132.
- Pier, G.B. 1985. Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* 151: 575-580.
- Racker, E. 1949. Bovine liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 177: 883-892.
- 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
- Rodríguez-Zavala J.S. y Weiner H. 2002. Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry.* 41: 8229-8237.
- Rossmann, M.G., Moras, D. y Olsen, K.W. 1974. Chemical and biological evolution of nucleotide binding protein. *Nature.* 250: 194-199.
- Rothschild, H.A. y Guzman-Barron, E.S. 1954. The oxidation of betaine aldehyde by aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 209: 511-523.
- Salvano, M.A., Lisa, A.T. y Domenech, C.E. 1989. Choline transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Cell. Biochem.* 85: 81-89.
- Sage, A. y Vasil, M. 1997. Osmoprotectant-dependent expression of *plcH*, encoding the hemolytic phospholipase C, is subject to novel catabolite repression control in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.* 179: 4874-4881.
- Sali, A.; Webb, B.; Madhusudhan, M. S.; Shen, M.-Y.; Marti-Renom, M. A.; Eswar, N.; Alber, F.; Topf, M.; Oliva, B.; Fiser, A.; Sánchez, R.; Yerkovich, B.; Badretdinov, A.; Melo, F.; Overington, J. P. y Feyfant, E. *MODELLER. A program for protein structure modeling, Version 9V4*; University of California: San Francisco, CA, 2008.
- Shirasawa, K., Takabe, T. y Kishitani, S. 2006. Accumulation of glycine betaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic

stress. *Annals of Botany*. 98: 565-571.

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

Sophos, N. y Vasiliou, V. 2003. Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update *Chem.-Biol. Interact.* 143-144: 5-22.

Steinman, C.R. y Jakoby, W.B. 1967. Yeast aldehyde dehydrogenase 1. Purification and crystallization. *J. Biol. Chem.* 242: 5019-5023.

Steinmetz, C.G., Xie, P., Weiner, H. y Hurley, T.D. 1997. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5: 701-711.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warren, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong K.S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer J., Saier, M.H., Hancock R.E., Lory S. y Olson, M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959-964.

Tylichová, M., Kopečný, D., Moréra, S., Briozzo, P., Lenobel, R., Snégaroff, J. y Šebela M. 2010. Structural and functional characterization of plant aminoaldehyde dehydrogenase from *pisum sativum* with a broad specificity for natural and synthetic aminoaldehydes *J. Mol. Biol.*, doi:10.1016/j.jmb.2009.12.015.

Trossat, C., Rathinasabapathi, B. y Hanson, A.D. 1997. Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and ω -aminoaldehydes. *Plant Physiol.* 113:1457-1461.

Vaz, F.M., Fouchier, S.W., Ofman, R., Sommer, M. y Wanders, R.J. 2000. Molecular and biochemical characterization of rat gamma-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 275: 7390-7394.

Valenzuela-Soto, E.M. 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.

- Valenzuela-Soto, E.M., Velasco-García, R., Mujica-Jiménez, C., Gaviria-González, L. y Muñoz-Clares, R.A. 2003. Monovalent cation requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chem-Biol Interact.* 143-144: 139-148.
- Vasiliou, V., Bairoch, A., Tipton, K.F. y Nebert, D.W. 1999. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based on divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics.* 9: 421-434.
- Vasiliou, V. y Nebert, D. 2005. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum. Genomics.* 2: 138-143.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. y Muñoz-Clares R.A. 1999. Rapid purification and properties of betaine aldehydedehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 181: 1292-1300.
- Velasco-García, R, González-Segura, L. y Muñoz-Clares, R.A. 2000. Steady-state kinetic mechanism of NADP⁺ and NAD⁺ dependent reactions catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* 352: 675–683.
- Velasco-García, R., Villalobos, M.A., Ramirez-Romero M.A., Mujica-Jímenez, C., Iturriaga G. y Muñoz-Clares R.A. 2006a. Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* over-expression in *Escherichia coli*, and regulation by choline and salt. *Arch. Microbiol.* 185: 14-22.
- Velasco-Garcia, R., Zaldivar-Machorro, V.J., Mujica-Jimenez, C., Gonzalez-Segura, L. y Muñoz-Clares, R.A. 2006b. Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase. A potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 341: 408-415.
- Vojtechová, M., Hanson, A.D. y Muñoz-Clares, R.A. 1997. Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺ dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* 337: 81-88.
- Wargo, M., Szwergold, B. y Hogan, D. 2008. Identification of two gene clusters and a transcriptional regulator required for *Pseudomonas aeruginosa* glycine betaina catabolism. *J. Bacteriol.* 190: 2690–2699.

- Warren, J.R. y Gordon, J.A. 1966. On the refractive indices of aqueous solutions of urea. *J. Phys. Chem.* 70: 297–300.
- Wei, B., Ni, L., Hurley, T.D. y Weiner, H. 2000. Cooperativity in nicotinamide adenine dinucleotide binding induced by mutations of arginine 475 located at the subunit interface in the human liver mitochondrial class 2 aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry.* 39; 5295–5302.
- Wei, B. y Weiner, H. 2001. Making an Oriental equivalent of the yeast cytosolic aldehyde dehydrogenase as well as making one with positive cooperativity in coenzyme binding by mutations of glutamate 492 and arginine 480. *Chem-Biol Interact.* 130-132: 73–179
- Weigel P., Weretilnyk E.A. y Hanson A.D. 1986. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 82: 753-759.
- Weretilnyk E.A. y Hanson A.D. 1989. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves: Purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 271: 56-63.
- Wright, J.R. y Clements, J.A. 1987. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 2: 426–444.
- Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. y Chang, C. 1998. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* 251: 549-557.