



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Identificación de los residuos implicados en la inactivación
de las aldehído deshidrogenasas humanas por los
productos de la peroxidación lipídica**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

Luis Francisco Calleja Castañeda



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



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: Profesor: Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

VOCAL: Profesor: Dr. José Pedraza Chaverri

SECRETARIO: Profesor: Dr. José Salud Rodríguez Zavala

1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Laura Carmona Salazar

2° SUPLENTE: Profesor: Dra. Aurora Lara Nuñez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTO DE BIOQUÍMICA. INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Salud Rodríguez Zavala

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Belem Yoval Sánchez

SUSTENTANTE:

Luis Francisco Calleja Castañeda

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Cinética enzimática	3
2.2. Generalidades de aldehído deshidrogenasas	5
2.3. Mecanismo de reacción	5
2.4. Nomenclatura, estructura y función de las ALDHs en el organismo	7
2.4.1. ALDH1A1	9
2.4.2. ALDH2	10
2.4.3. ALDH3A1	10
2.5. Peroxidación lipídica	11
2.6. Formación de subproductos durante la peroxidación lipídica	13
2.7. Relevancia fisiológica de los subproductos de la peroxidación lipídica	13
2.8. Fuentes de contaminación por acroleína y riesgos para la salud	14
3. Antecedentes	17
3.1. Susceptibilidad de las ALDHs a acroleína	17
4. Hipótesis	20
5. Objetivo general	20
6. Objetivos particulares	20
7. Materiales y métodos	21
7.1. Diseño de oligonucleótidos	21

7.2. Obtención de las mutantes H3T242C y H3V244C	21
7.2.1. Concentración de reactivos para obtener los fragmentos por PCR	22
7.2.2. Concentración de reactivos para obtener el traslape	22
7.2.3. Condiciones para el PCR	22
7.3. Electroforesis en gel de agarosa (DNA)	23
7.4. Extracción de DNA a partir de geles de agarosa	23
7.5. Ligación al vector de sobre-expresión pT77-His	24
7.5.1. Condición para la reacción de ligación	24
7.6. Transformación en células DH5- α	24
7.7. Extracción de DNA a partir de cultivos bacterianos	25
7.8. Análisis de restricción	26
7.8.1. Concentraciones de reactivos para la reacción de restricción	27
7.9. Análisis de secuenciación	27
7.10. Obtención de células competentes	28
7.11. Transformación en células competentes de E. coli de la cepa BL21	28
7.12. Expresión y purificación de las proteínas recombinantes	29
7.13. Cuantificación de proteína	29
7.14. Electroforesis de la proteína en geles de poliacrilamida SDS	30
7.15. Determinación de la pureza de la proteína	31
7.16. Análisis cinético	31

7.16.1. Caracterización cinética	31
7.16.2. Evaluación de la susceptibilidad a acroleína	31
8. Resultados y discusión	33
8.1. Diseño de oligonucleótidos	33
8.2. Obtención y amplificación de los genes	33
8.3. Ligación del gen al vector de clonación y transformación en células DH5- α	35
8.4. Análisis de la secuencia de aminoácidos	37
8.5. Sobre-expresión y purificación de las proteínas recombinantes	37
8.6. Determinación de los parámetros cinéticos	38
9. Discusión general	50
10. Conclusiones	55
11. Perspectivas	56
12. Referencias bibliográficas	57

Abreviaturas

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ALDH1A1	Aldehído deshidrogenasa clase 1A1
ALDH2	Aldehído deshidrogenasa clase 2
ALDH3A1	Aldehído deshidrogenasa clase 3A1
H3T242C	Enzima mutada de la aldehído deshidrogenasa clase 3A1, cambio de la treonina 242 por una cisteína
H3V244C	Enzima mutada de la aldehído deshidrogenasa clase 3A1, cambio de la valina 244 por una cisteína
NAD ⁺	Nicotinamida adenina nucleótido (Oxidado)
NADH	Nicotinamida adenina nucleótido (Reducida)
4-HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
MDA	Malondialdehído
DOPAL	3,4-Dihidroxifenilacetaldehído
DOPAC	3,4-Dihidroxifenilacético
ROS	Especies reactivas de oxígeno
MAO	Monoaminooxidasa
LPO	Peroxidación lipídica

Resumen

Diversos aldehídos generados durante la peroxidación lipídica están involucrados en la etiología y patogénesis de varias enfermedades, en las que se genera un aumento en los niveles de estrés oxidante. Ejemplos de estas enfermedades son: arteriosclerosis, diabetes y obesidad, así como enfermedades neurodegenerativas tales como Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple. Estos aldehídos, en particular el 4-hidroxi-2-nonenalaldehído (4-HNE) y la acroleína ejercen sus efectos citotóxicos a través de la alquilación de grupos nucleofílicos, causando la inactivación de proteínas y generando daño sobre el ácido desoxirribonucleico (DNA), lo cual puede promover mutagénesis.

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) catalizan la oxidación de una amplia variedad de aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos usando nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+) como coenzima. Diferentes isoformas de ALDHs (ALDH1A1, ALDH2, ALDH3A1) se han estudiado en cuanto a su capacidad de desintoxicar a la célula de estos aldehídos lipídicos. Datos recientes reportados por nuestro grupo de trabajo revelan que la ALDH1A1 y la ALDH2 son inactivadas a concentraciones menores a $10 \mu\text{M}$ por estos aldehídos tóxicos, mientras que la ALDH3A1 resiste concentraciones de estos aldehídos 50-100 veces mayores. En base al análisis de la secuencia de aminoácidos del sitio activo de la ALDH1A1, la ALDH2 y la ALDH3A1, se propuso como blanco de la inactivación a los residuos de cisteína adyacentes a la cisteína catalítica en el sitio de unión del aldehído; pues la ALDH1A1 y la ALDH2 tienen 1 y 2 residuos de cisteína adyacentes a la cisteína catalítica, respectivamente (siendo la ALDH2 la isoforma más sensible a la inactivación por los aldehídos lipídicos), por su parte la ALDH3A1 únicamente presenta la cisteína catalítica. Con el fin de evaluar el papel e importancia de dichos residuos, se generaron dos mutantes sencillas de la ALDH3A1 humana, cambiando los aminoácidos adyacentes a la cisteína reactiva en el sitio de unión del aldehído en las posiciones 242 y 244 por residuos de cisteína (mutantes H3T242C y H3V244C, respectivamente).

Se determinaron los parámetros cinéticos de las mutantes generadas en presencia de benzaldehído y acroleína, así como la susceptibilidad de estas en presencia del último compuesto, por ser uno de los productos de la peroxidación lipídica más dañino para este grupo de enzimas. Los resultados obtenidos revelaron un incremento de 4 veces en el valor de K_m por benzaldehído en las mutantes con respecto a la enzima silvestre, lo cual sugiere que disminuyó la afinidad por este compuesto, mientras que el valor de K_m por NAD^+ no cambió significativamente. Por otro lado, la afinidad por acroleína aumentó aproximadamente 3 veces para la mutante H3V244C, respecto a la ALDH3A1; por el contrario, esta disminuyó a la mitad para H3T242C. Con respecto a la susceptibilidad por acroleína, se observó que las mutantes H3V244C y H3T242C fueron más susceptibles, pues se inactivaron a concentraciones de 4 y 11 mM de acroleína, respectivamente; mientras que la ALDH3A1 no se inactivó incluso a concentraciones de 20 mM. En otro protocolo al incubar las proteínas en presencia de acroleína por 5 minutos en ausencia de sustratos se demostró que, la enzima H3V244C es la mutante más sensible, ya que comenzó a inactivarse a partir de 1 μM de acroleína, H3T242C lo hizo a partir de 5 μM , mientras que la enzima silvestre comenzó a inactivarse por arriba de 50 μM de dicho aldehído. Aunado a este análisis, se evaluó la protección que ejercen en el sitio catalítico, tanto el NADH, como el benzaldehído ante la inactivación por acroleína. A este respecto, se observó que en presencia de concentración saturante de ambos sustratos, H3V244C y H3T242C se protegen de la inactivación en un 50 y 60%, respectivamente; mientras que dichos sustratos por separado no ejercen ningún efecto. Cabe mencionar que en estas condiciones, la ALDH3 se protege 100% de la inactivación. Estos resultados sugieren que los residuos de cisteína adyacentes a la cisteína catalítica en el sitio de unión del aldehído, son un blanco determinante en la inactivación de estas enzimas por los productos de la peroxidación lipídica.

Introducción

Cinética enzimática

Las enzimas son catalizadores biológicos que disminuyen la energía de activación de una reacción, transformando un determinado sustrato en producto. Para que esto ocurra, el sustrato [S] se une a la enzima [E] y se forma un complejo entre la enzima y el sustrato [ES], para finalmente dar lugar a la formación y liberación de los productos e iniciar un nuevo ciclo catalítico.

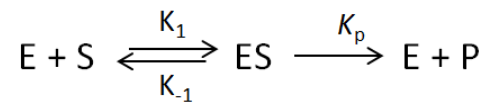


Figura 1. Modelo de Michaelis - Menten para reacciones catalizadas por enzimas. En este modelo la enzima [E] se combina reversiblemente con su sustrato [S] para formar el complejo enzima-sustrato [ES] que subsecuentemente se rompe para formar el producto [P].

El perfil de velocidad de algunas enzimas, incluidas las aldehído deshidrogenasas (ALDHs), presenta un comportamiento hiperbólico al incrementar la concentración de sustrato. Este comportamiento es explicado por la ecuación de Michaelis-Menten, la cual describe como varía la velocidad de reacción conforme aumenta la concentración de sustrato.

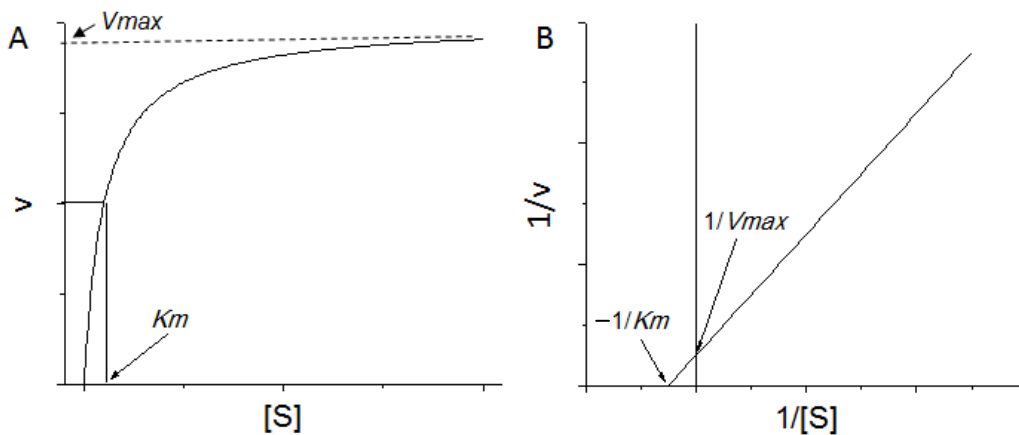


Figura 2. (A) Representación gráfica de una cinética michaeliana. (B) Gráfico de Lineweaver-Burk o dobles recíprocos de una cinética michaeliana.

La constante de Michaelis–Menten (K_m), se define como la concentración de sustrato a la cual una enzima alcanza la mitad de la velocidad máxima y su valor es un reflejo de la afinidad que tiene una enzima por su sustrato, de este modo un valor numérico pequeño de K_m refleja una alta afinidad de la enzima por el sustrato, mientras que un valor de K_m más alto refleja una menor afinidad por el sustrato. Cuando la concentración de sustrato es 10 veces mayor a la K_m se dice que la enzima está saturada por éste y por tanto, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la formación del complejo [ES].

La V_{max} , es la velocidad máxima que alcanza la enzima al encontrarse en una concentración saturante de sustrato. Por otro lado la K_{cat} es la constante de velocidad que indica la cantidad de producto que libera un mol de enzima por segundo. Esta constante se calcula a partir de la velocidad máxima y el peso molecular de la proteína y se obtiene experimentalmente a partir de enzimas puras, por lo general enzimas recombinantes.

A pesar de que la K_{cat} indica que tan rápida puede ser una enzima, su capacidad catalítica también depende de la afinidad que tiene por su sustrato. De esta manera, las relaciones K_{cat}/K_m (potencial catalítico) (Eisenthal et al., 2007) y V_{max}/K_m (eficiencia catalítica), conjuntan la velocidad de captura del sustrato y la liberación del producto (Northrop, 1999). La diferencia entre ellos radica en que la K_{cat}/K_m permite comparar potenciales catalíticos entre enzimas puras de las cuales se conoce su peso molecular, mientras que la V_{max}/K_m es útil para enzimas no puras o que se encuentran en un extracto celular y por lo tanto el valor dependerá de la cantidad de enzima contenida en la muestra.

Generalidades de las aldehído deshidrogenasas

La superfamilia de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs), comprende un grupo de enzimas involucradas en el metabolismo de un amplio espectro de aldehídos aromáticos y alifáticos, los cuales son generados a partir de diferentes precursores endógenos y exógenos; estas enzimas catalizan la oxidación de dichos aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos utilizando NAD(P)^+ como coenzima (Figura 3). Los aldehídos endógenos se forman durante el metabolismo de alcoholes, aminoácidos, vitaminas, esteroides y lípidos, mientras que los aldehídos exógenos suelen generarse por el metabolismo de fármacos, agentes ambientales y por la combustión de hidrocarburos. Los aldehídos exógenos, también se pueden adquirir a partir de la dieta (Vasilis et al., 2000).

Mecanismo de reacción

El mecanismo de reacción de este grupo de enzimas es secuencial ordenado (Figura 3), lo cual indica que los sustratos entran y salen en un orden estricto. En un primer paso la coenzima oxidada (NAD^+) se une a la enzima libre, lo que genera un cambio conformacional que se refleja en la disminución en el pK_a del residuo de cisteína catalítico (Cys243 en la ALDH3A1, y Cys302 en la ALDH1A1 y la ALDH2) (Marchal et al., 1999), de este modo la forma ionizada del grupo sulfhidrilo reacciona con el aldehído generando un intermediario tiohemiacetal. El siguiente paso de la reacción es la transferencia de un hidrógeno en forma de hidruro, esta transferencia se da del intermediario tiohemiacetal al NAD^+ el cual se reduce a NADH, en este paso se forma un intermediario tioéster. Después de la transferencia del hidruro, cambia la rotación de los enlaces del grupo pirofosfato del NADH (MacGibbon et al., 1977), lo cual favorece la conformación de salida de la coenzima reducida. Finalmente, un ion hidroxilo; producto de la desprotonación de una molécula de agua por la base general (E333 en la ALDH3A1 y E268 en la ALDH1A1 y la ALDH2) (Wang et al., 1995; Mann et al., 1999), realiza un ataque nucleofílico sobre el carbonilo del intermediario tioéster, de este modo se genera el

acilo que es el primer producto liberado por la enzima y por último es liberada la coenzima reducida (NADH), que es el segundo producto.

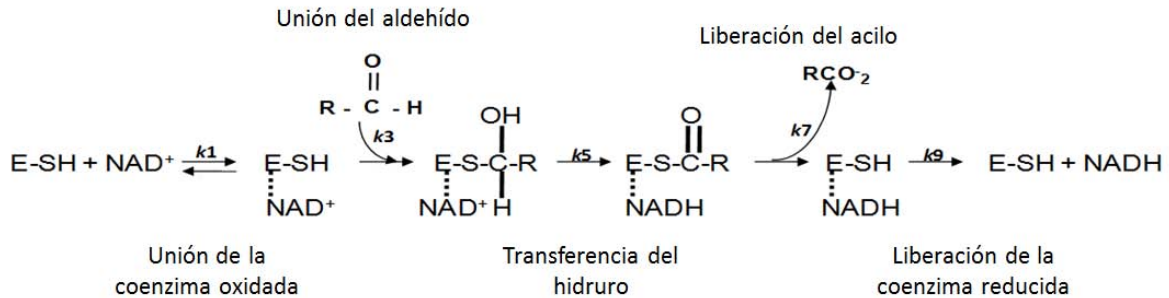


Figura 3. Mecanismo general de reacción para la oxidación de aldehídos por las ALDHs (Rodríguez-Zavala et al., 2006).

A pesar de que todas las isoformas de ALDH presentan el mismo mecanismo cinético, cada una difiere en su paso limitante. El paso limitante para la ALDH1A1 es la disociación o liberación de la coenzima reducida (Blackwell et al., 1987), mientras que para la ALDH2 lo es la desacilación o liberación del acilo (Weiner et al., 1976) y finalmente para la ALDH3A1 el paso limitante es la transferencia del hidruro (Mann, et al., 1999). Algunos cationes divalentes como el Ca^{2+} , el Mg^{2+} y el Mn^{2+} , afectan la actividad específica de algunas isoformas de aldehído deshidrogenasas humanas, lo que nos permite diferenciar la etapa limitante de la reacción en cada una. Estos cationes incrementan la actividad de la ALDH2, inhiben a la ALDH1A1 y no ejercen efecto sobre la actividad de la ALDH3A1 (Ho et al., 2005). Estudios cristalográficos revelaron que el Mg^{2+} interactúa con el grupo pirofosfato del NADH, lo que promueve que la coenzima se una más fuertemente a la enzima, haciendo más lenta su velocidad de liberación; al ser este el paso limitante de la reacción en la ALDH1A1, se observa una disminución en la velocidad global de la reacción (Takahashi et al., 1980; Vallari et al., 1984). La unión de este catión también promueve que la coenzima reducida adopte la conformación de salida, lo cual favorece que ocurra la desacilación y al ser este el paso limitante de la reacción para la ALDH2, el resultado es un incremento en la velocidad global de la reacción (Dickinson, et al., 1982; Bennett, et al., 1983).

Nomenclatura, estructura y función de las ALDHs en el organismo.

En el año 1998 se estableció por los participantes de la novena reunión internacional de enzimología y biología molecular del metabolismo del grupo carbonilo, un nuevo sistema de nomenclatura para las ALDHs basado en la evolución, sustituyendo la clasificación basada en la especificidad por sustrato. En el sistema de nomenclatura actual de las ALDHs, para nombrar cada gen primero se utiliza el símbolo ALDH de la raíz de este grupo de enzimas, seguido por el número arábigo que representa la familia y cuando sea necesario una letra mayúscula que designa la subfamilia. El número arábigo que sigue a la letra indica el gene individual dentro de la subfamilia. Para que una ALDH sea miembro de una familia, debe tener al menos un 70% de identidad de aminoácidos con el resto de proteínas pertenecientes a la familia de ALDHs y para que dos proteínas pertenezcan a una subfamilia deben tener más del 85% de identidad de aminoácidos (Hempel et al., 1993).

Las aldehído deshidrogenasas son enzimas tejido específicas (Tabla 1) (Vasilis et al., 2000); en el humano se han descrito 20 genes que codifican para diferentes isoformas de aldehído deshidrogenasas, siendo las isoformas ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1 las más estudiadas por ser las primeras en caracterizarse (Klyosov et al., 1996). La importancia de este grupo de enzimas, radica en las funciones que desempeñan en el organismo, pues a pesar de que su principal función es la desintoxicación de aldehídos endógenos y exógenos, algunas isoformas también participan en procesos celulares, transformando intermediarios de algunas vías metabólicas o llevan a cabo la oxidación de algunos aldehídos que participan en vías de señalización, ya sea como mensajeros intracelulares o reguladores de la transcripción (Vasilis et al., 2000).

Tabla1. Localización tisular de algunas ALDHs humanas y la preferencia de estas por sustratos.

Gene	Nombre trivial	Localización tisular	Sustratos
ALDH1A1	ALDH1	Cerebro, córnea, retina e hígado	Retinal, acetaldehído
ALDH1A2	RALDH2	Cerebro, hígado y próstata	Retinal
ALDH1A3	RALDH3	Glándulas salivales, estómago y riñón	Retinal
ALDH1B1	ALDH5	Hígado, testículo, músculo esquelético	Acetaldehído
ALDH1L1	FDH	Hígado	Formiltetrahidrofolato
ALDH2	ALDH2	Hígado, Corazón	Acetaldehído
ALDH3A1	ALDH3	Córnea y tracto gastrointestinal	Aldehídos aromáticos
ALDH3A2	ALDH10	Hígado	Aldehídos grasos
ALDH3B1	ALDH7	Riñón, pulmón y cerebro	Desconocido
ALDH3B2	ALDH8	Desconocido	Desconocido
ALDH4A1	ALDH4	Hígado, riñón, corazón y cerebro	Glutamato γ -semialdehído
ALDH5A1	SSDH	Hígado y cerebro	Succinato semialdehído
ALDH6A1	MMSDH	Riñón, hígado y músculo esquelético	Metilmalonato semialdehído
ALDH8A1	ALDH12	Desconocido	Desconocido
ALDH9A1	ALDH9	Hígado, músculo esquelético y riñón	Aminoaldehídos
ALDH18A1	P5CS(DH)	Intestino	Glutamato γ -semialdehído

Modificado de Vasilis et al., (2000)

En cuanto a su localización a nivel intracelular, se ha descrito que la ALDH1A1 y la ALDH3A1 son citosólicas (Hempel et al., 1984; Lassen et al., 2007), mientras que la ALDH2 es mitocondrial (Takahashi et al., 1980; Maeda et al., 1988). La expresión de estas enzimas es constitutiva, como es el caso de la ALDH1A1 que junto con la ALDH3A1 representan un 50% de la proteína soluble en la córnea (Larson et al., 2007; King et al., 1998); pero además son inducibles y pueden expresarse bajo ciertos estímulos, como es el caso de la ALDH2, la cual se sobreexpresa en el hígado después de la ingesta de bebidas alcohólicas. La sobreexpresión de las ALDHs, también está regulada por diferentes factores de

transcripción y por el aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS), cuando se rebasa la capacidad antioxidante (Vasilis et al., 2000). El estado de oligomerización de las diferentes isoformas de ALDH también es variable. La ALDH1A1 y la ALDH2 son tetrámeros que comparten más de 70% de identidad, mientras que la ALDH3A1 es un dímero que comparte un 30% de identidad con las isoformas tetraméricas (Liu et al., 1997; Steinmetz et al., 1997; Moore et al., 1998; Ni et al., 1999) Es importante mencionar que la ALDH1A1 y la ALDH2 presentan una extensión de 56 aminoácidos en el amino terminal, respecto a la ALDH3A1, la cual posee una extensión de 17 aminoácidos en el carboxilo terminal, a diferencia de las primeras dos enzimas (Rodríguez-Zavala et al., 2001; Zhoud et al., 2001). En cuanto a la especificidad por sustratos, la ALDH1A1 utiliza aldehídos alifáticos de cadena corta mediana y larga, así como aldehídos aromáticos. La ALDH2 toma con alta afinidad aldehídos alifáticos de cadena corta, tales como el acetaldehído y propionaldehído (Klyosov et al., 1996) mientras que la ALDH3A1 toma preferentemente aldehídos aromáticos y aldehídos alifáticos de cadena larga (Pappa et al., 2003).

ALDH1A1

La ALDH1A1 juega un papel importante durante la embriogénesis, ya que participa en el metabolismo de la vitamina A (Retinol). Después de llevarse a cabo la oxidación del retinol a retinaldehído por una enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), la ALDH1A1 toma el aldehído y lo oxida, generando ácido retinoico, que es un mensajero intracelular y regulador transcripcional esencial durante el crecimiento, diferenciación celular y desarrollo del embrión (Duester, 2000). En el sistema nervioso central (SNC), la monoaminooxidasa (MAO) se encarga del metabolismo de la dopamina. Durante este proceso se genera el metabolito 3,4-dihidroxifenil-acetaldehído (DOPAL), cuya acumulación es neurotóxica y puede llevar a la muerte celular asociada con patologías del SNC (Marchitti et al., 2007). La ALDH1A1 se encarga de mantener bajos los niveles de este aldehído, mediante su oxidación al ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) (Galter et al., 2003; Marchitti et al., 2007).

ALDH2

La ALDH2 fue la primera enzima en relacionarse con la desintoxicación del acetaldehído generado durante el metabolismo del etanol en el hígado (Feldman et al., 1971). Recientemente se ha encontrado que la ALDH2, es responsable de la activación de la nitroglicerina que se utiliza para tratar la insuficiencia cardíaca y angina de pecho, mediante la reducción de la nitroglicerina a nitrito, que posteriormente se metaboliza en la mitocondria por la enzima nitrato reductasa (NR) generando óxido nítrico (NO), que es un mensajero intracelular que regula la actividad celular (Chen et al., 2006). También se ha descrito que la activación de esta enzima, mediante la administración del compuesto ALDA-1 antes de un evento isquémico, reduce el tamaño del infarto un 60% (Cheng et al., 2008). Lo anterior se asocia con la disminución de los niveles de 4-HNE, pues éste es uno de los principales compuestos que se acumulan durante la isquemia, por lo que se ha propuesto que la eliminación de este compuesto por la ALDH2, puede ser uno de los mecanismos por los cuales esta enzima protege al corazón del daño generado (Eaton et al., 1999).

ALDH3A1

Por otra parte, la ALDH3A1 se expresa principalmente en la córnea de los mamíferos y su función principal es proteger al cristalino de la formación de radicales libres generados por la luz ultravioleta (UV). Además, esta enzima lleva a cabo la desintoxicación de los aldehídos generados a partir de la peroxidación lipídica producida por los rayos UV (Pappa et al., 2003). Por otro lado se ha descrito que la sobre-expresión de esta enzima en líneas celulares de cáncer de próstata, se relaciona con la progresión de la enfermedad y se sugiere que este incremento en la expresión de la enzima promueve la metástasis (Yan et al., 2014). Esta isoforma también se expresa de forma constitutiva en el tracto gastrointestinal y las vías urinarias, desintoxicando al organismo de los aldehídos generados a nivel endógeno y de aquellos adquiridos a través de la dieta (Hsu et al., 1992; Boesch et al., 1996).

Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica (LPO) fue definida como el deterioro oxidativo de lípidos poliinsaturados (Tappel et al., 1953). Durante este proceso los radicales libres capturan electrones de los lípidos de las membranas celulares y está dada por tres fases, la iniciación, propagación y la fase de terminación. Durante la **fase de iniciación**, los ROS altamente reactivos como el radical hidroxilo (OH^\bullet) o el radical hidroperoxilo ($^\bullet\text{HO}_2$) atacan átomos de carbono adyacentes a los dobles enlaces de ácidos grasos poliinsaturados, que tienen grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) y cuyos hidrógenos son especialmente reactivos, el electrón libre se transfiere al lípido formando un lípido radical y agua. Los ROS menos reactivos como H_2O_2 no son capaces de iniciar esta reacción (Blake et al., 1987).

El radical lipídico generado durante la fase de iniciación no es una molécula estable, por lo que comienza una deslocalización del electrón libre por resonancia. Sin embargo, este radical lipídico continúa siendo una molécula inestable, capaz de reaccionar espontáneamente con oxígeno molecular para formar un radical peróxido lipídico, igualmente inestable.

En la **fase de propagación**, el radical peróxido lipídico reacciona con otro ácido graso vecino, produciendo otro radical de ácido graso, el cual, a su vez, reacciona con el oxígeno molecular para formar otro peróxido lipídico. Este mecanismo se denomina, reacción en cadena de radicales. El nivel de daño producido por varias moléculas radicales durante la peroxidación lipídica es alto, ya que pueden oxidar aproximadamente el 50% de ácidos grasos insaturados presentes en la membrana plasmática (Kothari et al., 2010).

La propagación de la peroxidación lipídica llega a su fin cuando un radical peróxido lipídico reacciona con otro radical, produciendo un producto estable, al formar un enlace covalente. Esta **fase de terminación**, comienza cuando existe una alta concentración de radicales lipídicos, de modo que la probabilidad de que dos radicales puedan reaccionar es alta.

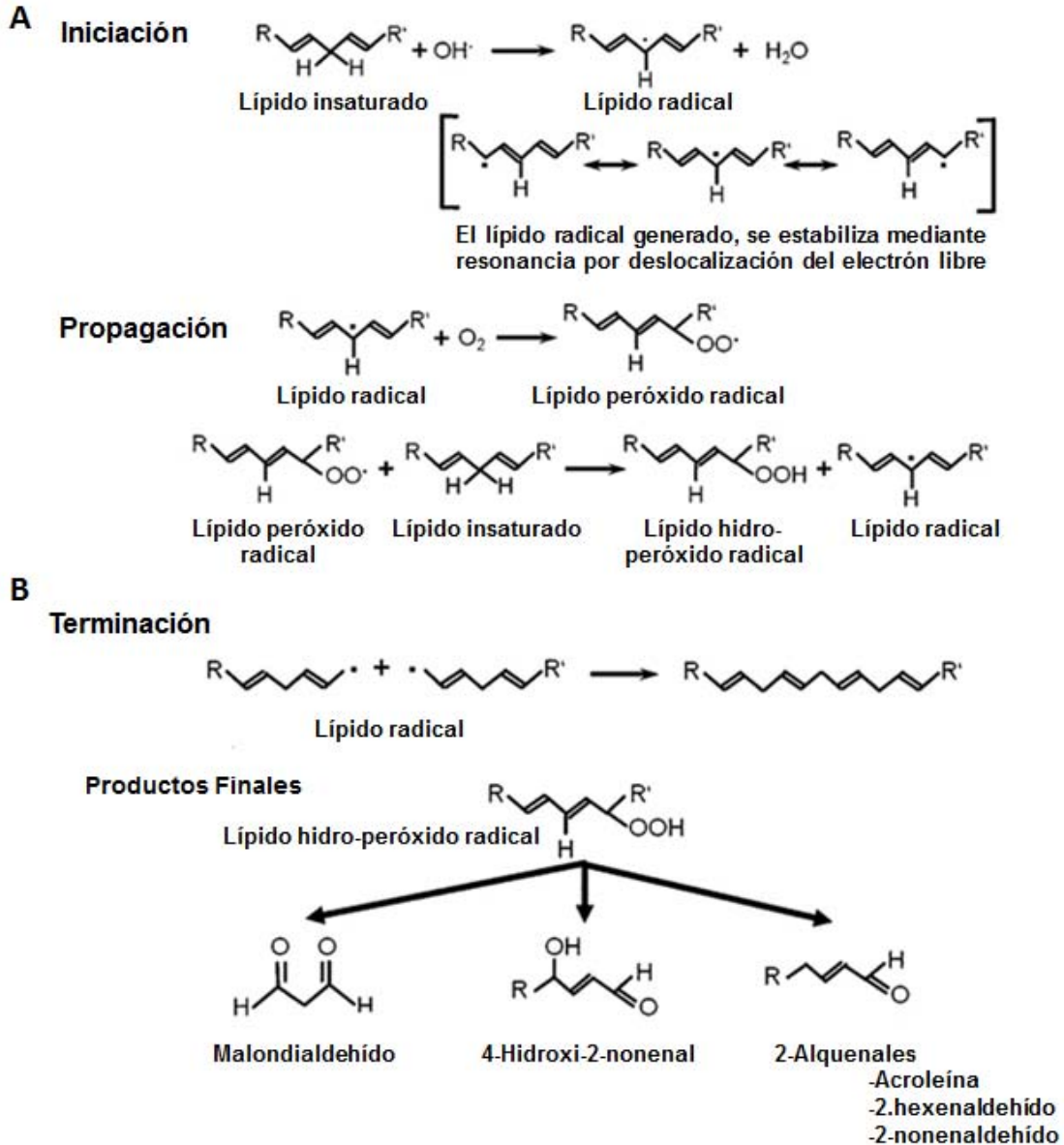


Figura 4. Peroxidación lipídica. (a) Fase de iniciación y propagación por radicales. En la fase inicial, el radical lipídico se estabiliza en diferentes estructuras de resonancia por deslocalización de los electrones libres. En la fase de propagación, los radicales lipídicos reaccionan con oxígeno molecular para formar un radical peróxido lipídico que se propaga por medio de una reacción en cadena de radicales. (b) En la fase de terminación, dos radicales de lípidos reaccionan entre sí para formar un enlace estable. Además, de los radicales hidropoxilo de lípidos, se forman una variedad de productos de degradación como malondialdehído, 4-hidroxi-2-alquenes o 2-alquenes.

Formación de subproductos durante peroxidación lipídica

Durante la peroxidación lipídica, los radicales libres atacan a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares oxidándolos, estos ácidos grasos peroxidados se descomponen y sufren un acortamiento de su cadena lateral y se obtienen subproductos tales como el malondialdehído (MDA), 2-alquenes y 4-hidroxi-2-alquenes como es el caso del 4-hidroxi-nonenal. Se ha descrito que el MDA es altamente mutagénico, mientras que el 4-hidroxi-nonenal es altamente genotóxico (Luczaj et al., 2003).

Por lo tanto, la peroxidación lipídica no sólo ejerce daño directo en las membranas y en su función biológica, sino también de manera indirecta a través de los subproductos generados, propiciando la formación de aductos con el DNA y proteínas (Esterbauer, 1993).

Relevancia fisiológica de los subproductos de la peroxidación lipídica

Los productos de la peroxidación lipídica, tales como malondialdehído, acroleína y 4-hidroxi-2-nonenal, se han visto involucrados en diferentes etiologías en las que se genera un aumento en los niveles de estrés oxidante. El mecanismo por el cual estos compuestos generan una alta toxicidad se debe a su capacidad de formar aductos con proteínas y DNA, ejerciendo tanto citotoxicidad como genotoxicidad (Papazafiropoulou et al., 2011). En estudios previos se ha descrito, que los productos de la peroxidación, reaccionan preferentemente con aminoácidos nucleofílicos en el siguiente orden de preferencia: Cisteína>Histidina>Lisina, inactivando diversas enzimas y evitando que cumplan con su función en el organismo (Chávez et al., 2011). Por otra parte, se sabe que algunos aldehídos como el 4-HNE y el malondialdehído reaccionan con la deoxiadenosina y deoxiguanosina del DNA formando aductos (Kaneko et al., 2001).

La acroleína es el producto de la peroxidación lipídica más tóxico para el organismo, ya que es altamente reactivo y forma una mayor cantidad de aductos

con proteínas comparado con el MDA y 4-HNE (Chávez et al., 2011). La alta reactividad de este compuesto se debe a la α/β insaturación presente en su cadena. Este compuesto además de formarse como un subproducto de la peroxidación lipídica, también es un contaminante ambiental generado a partir de la combustión incompleta de hidrocarburos (Ratcliff et al., 2010).

Fuentes de contaminación por acroleína y riesgos para la salud.

La acroleína como se mencionó anteriormente, es un contaminante ambiental al que constantemente se encuentra expuesta la población, principalmente aquella que vive en ciudades industrializadas. Este aldehído se evapora y dispersa rápidamente en el aire cuando se queman combustibles como la gasolina, aceites, polímeros sintéticos y tabaco, es decir, podemos encontrar este compuesto en el humo generado del escape de los automóviles, de la madera quemada, en el humo de fábricas, el humo del cigarrillo, y también por la descomposición de los ácidos grasos cuando se fríen los alimentos.

Debido a que la acroleína es un compuesto ampliamente distribuido en el medioambiente, organizaciones de salud y riesgo ambiental, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), han establecido límites de exposición en el aire a este tóxico. La agencia de protección ambiental (EPA), ha clasificado a este compuesto como uno de los 10 contaminantes más riesgosos para la salud.

Se han medido niveles promedio de acroleína de 0.05 hasta 0.1 ppm en el aire urbano, lejos de las fuentes industriales. En el aire de interiores, se encontró que fumar un cigarrillo en 10 minutos producía concentraciones de vapor de acroleína de 0.2 a 0.5 ppm, por ello, los seres humanos están expuestos a este aldehído tóxico en el hogar a causa del tabaquismo. Mientras que, en el lugar de trabajo, principalmente en las industrias, la exposición puede ocurrir por la combustión de hidrocarburos, el calentamiento de material orgánico, el corte o sellado de láminas entre otros, y se han medido niveles de hasta 5 a 10 ppm de acroleína en ese

ambiente de trabajo (Acrolein Health and Safety Guide No 67. Organización mundial de la salud. 1999).

Las personas sensibles a este tóxico, pueden detectar a la acroleína por su olor en concentraciones de 0.02 ppm y los ojos comienzan a irritarse con una exposición de 0.25 ppm. Con exposiciones superiores a 1 ppm de este tóxico ocurre edema de la tráquea y de los bronquios y puede provocar dificultad para respirar. En la tabla 2 se describe el efecto causado en los seres humanos por exposición aguda a la acroleína (Acrolein Health and Safety Guide No 67. Organización mundial de la salud. 1999).

Tabla 2

Umbrales para los efectos agudos de la acroleína en los seres humanos.

Concentración (ppm)	Tiempo (min)	Efecto
0.02	-	Percepción del olor
0.25	5	Irritación ocular
0.13	10	Irritación nasal
0.31	30	Disnea
0.44	5	Lagrimo
1	5	Irritación extrema de membranas mucosas

Hasta el momento, se desconocen los efectos de la exposición atmosférica de los seres humanos a la acroleína en niveles tolerables a largo plazo, aunque se ha descrito que la acroleína es un compuesto mutagénico y está clasificado en el grupo 2A, según la agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC), como un probable carcinógeno para los seres humanos; sin embargo, todavía no se cuenta con la información completa al respecto. Esta categoría se usa cuando hay evidencia limitada de efecto carcinógeno en humanos y suficiente evidencia de efecto carcinógeno en animales de experimentación (Manual de agentes

carcinogénicos de la IARC, 2006). Se ha determinado que la acroleína es un compuesto que inactiva potentemente a algunas isoformas de la familia de las ALDHs (Yoval-Sánchez et al., 2012), enzimas que se encargan de su desintoxicación, mediante la oxidación a ácido acrílico, que por sus propiedades químicas lo hace un compuesto más soluble en la sangre y puede ser fácilmente excretado por el riñón.

Antecedentes.

Susceptibilidad de las ALDHs a acroleína

Se ha determinado que la ALDH1A1, la ALDH2 y la ALDH3A1 poseen diferente susceptibilidad a los subproductos de la peroxidación lipídica, tales como acroleína, malondialdehído y 4-hidroxi-2-nonenal (Yoval-Sánchez et al., 2012). En comparación con las enzimas ALDH1A1 y ALDH3A1, la ALDH2 es la isoforma más susceptible a la inactivación por los subproductos de la peroxidación lipídica. Esta enzima se inactiva a partir de 5 μM de acroleína a un pH de 7.4, mientras que la ALDH1A1 y la ALDH3A1 no presentan inactivación incluso a concentraciones 6 y 600 veces más altas de este aldehído, respectivamente (Figura 5).

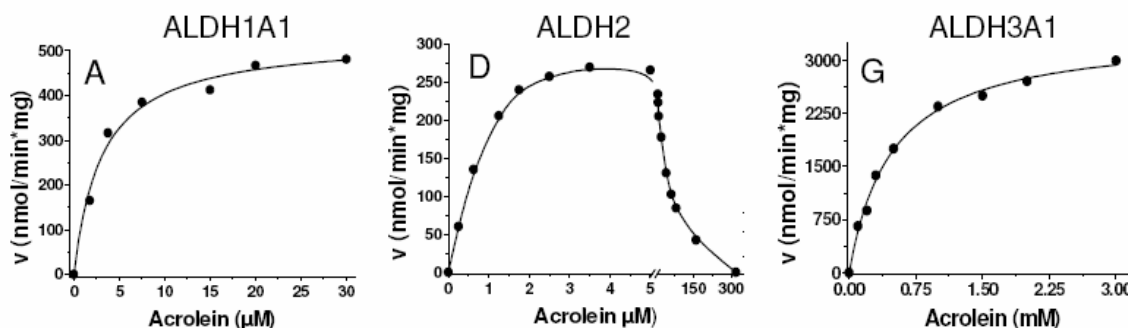


Figura 5. Perfil cinético de ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1 por acroleína a pH 7.4.

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que el 4-HNE y la acroleína reaccionan fuertemente con algunos aminoácidos nucleofílicos en el siguiente orden de preferencia: Cys>>>His>Lys; y se ha determinado que estos aldehídos no reaccionan con residuos de arginina (Doom et al., 2002).

Como se puede observar en la figura 6, las ALDHs presentan un residuo de cisteína en la posición 302 (C302) (equivalente al residuo 243 en la ALDH3A1) involucrado en la unión y oxidación del aldehído (cisteína catalítica). Adicionalmente a esta cisteína, la ALDH2 presenta dos residuos de Cys flanqueando a la C302, mientras que la ALDH1A1 presenta sólo una Cys extra, adyacente a la Cys 302 catalítica. Se ha propuesto que las cisteínas adyacentes a

la cisteína reactiva en el sitio catalítico podrían ser los blancos responsables de la inactivación por productos de la lipoperoxidación, pues la ALDH3A1 que es la isoforma más resistente a la inactivación, únicamente posee la cisteína catalítica (Yoval-Sánchez et al., 2012).

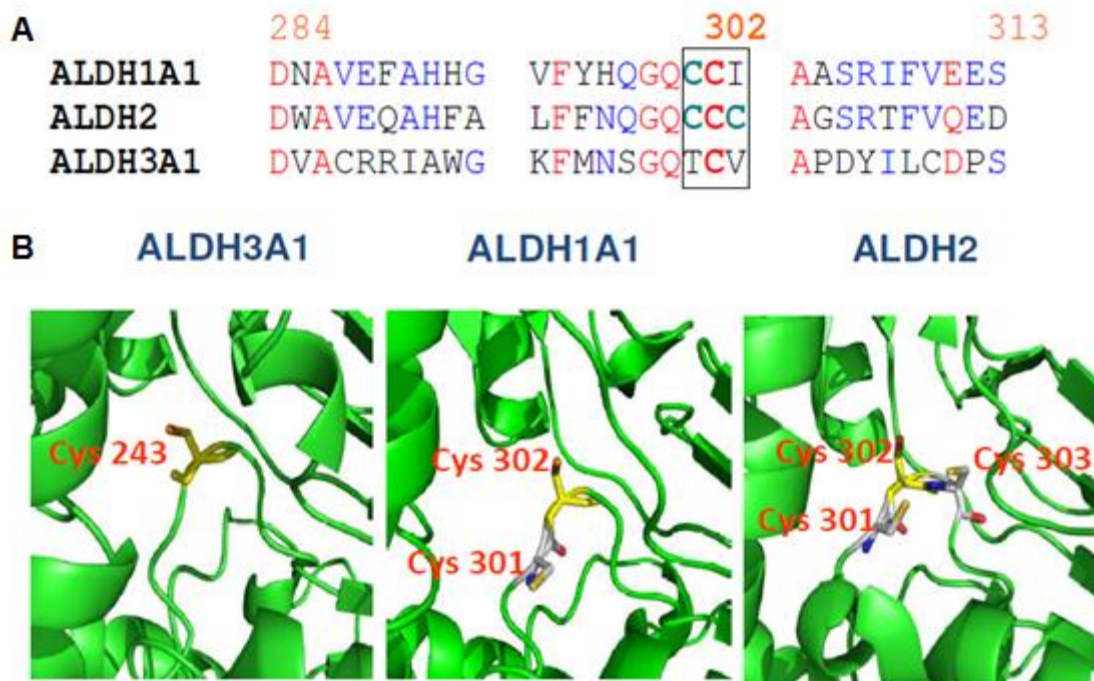


Figura 6. Secuencia de aminoácidos y estructura del sitio de unión del aldehído en las ALDHs humanas. (A) En el rectángulo se presentan los residuos de cisteína adyacentes a la Cys reactiva en la posición 302 (243 en ALDH3A1). La ALDH3A1 posee sólo la Cys reactiva. (B) Orientación de los residuos de Cys en el sitio de unión aldehído.

Se ha descrito que el valor de pK_a de la Cys es de 8.18, por lo tanto a un valor de pH mayor al pK_a el grupo sulfhídrido de la Cys se encuentra desprotonado, de esta manera los residuos de cisteína pueden reaccionar más fácilmente con los aldehídos lipídicos (acroleína y 4-HNE). A un pH de 9.5 (pH óptimo determinado para la mayoría de las isoformas de las ALDHs), la ALDH2 se inactiva a una concentración menor a 2 μ M mientras que la ALDH1A1 se inactiva a

concentraciones por arriba de 30 μM . Aun a este pH, la ALDH3A1 no se inactiva, incluso a concentraciones de 20 mM (Figura 7).

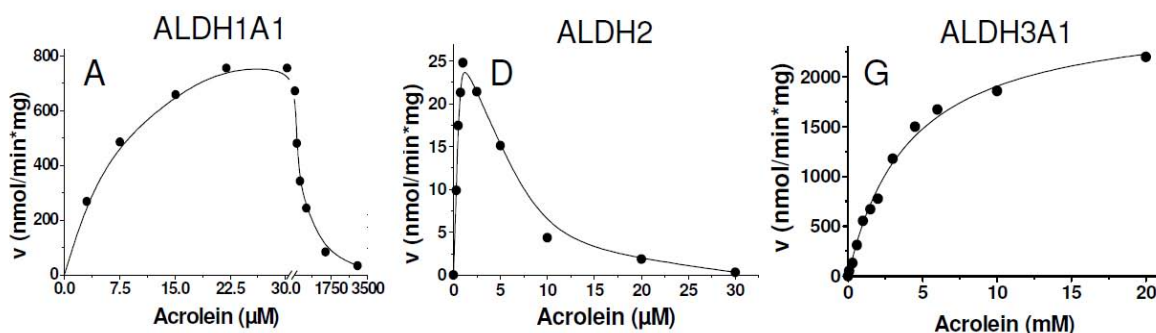


Figura 7. Perfil cinético de las ALDHs humanas con acroleína a pH 9.5.

Teniendo en consideración los perfiles cinéticos de las tres isoformas de ALDHs con acroleína y el hecho de que la acroleína y el 4-HNE forman aductos principalmente con residuos de Cys, proponemos que los residuos de Cys adyacentes a la Cys catalítica en el sitio de unión al aldehído, son los blancos de la inactivación de las ALDHs por estos aldehídos tóxicos. Para evaluar la participación de estos residuos en la susceptibilidad de las ALDHs a los aldehídos lipídicos, se generaron dos mutantes de ALDH3A1 humana, introduciendo residuos de Cys adyacentes a la cisteína reactiva (Cys243) en el sitio de unión del aldehído, mimetizando con ello lo que ocurre en la ALDH1A1 y la ALDH2.

Hipótesis

Los residuos de cisteína adyacentes a la Cys catalítica en el sitio de unión del aldehído, son blancos relacionados con la inactivación de las ALDHs por los productos de la peroxidación lipídica.

Objetivo general

Determinar cuáles son los aminoácidos que participan en la inactivación de las ALDHs por los aldehídos producidos durante la peroxidación lipídica, utilizando como modelo a la acroleína.

Objetivos particulares

1. Generar mutantes de ALDH3A1 humana sustituyendo la Thr242 por Cys y otra sustituyendo la Val244 por Cys.
2. Sobreexpresar y purificar la enzima silvestre ALDH3A1 y las enzimas mutantes H3T242C y H3V244C para realizar los ensayos correspondientes.
3. Determinar los parámetros cinéticos de las mutantes de ALDH3A1 humana en presencia de benzaldehído y acroleína.
4. Evaluar la susceptibilidad que presentan las mutantes H3T242C y H3V244C a la inactivación por la acroleína.

Materiales y métodos

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para generar las mutantes ALDH3-Thr242Cys (H3T242C) y ALDH3-Val244Cys (H3V244C), se diseñaron a partir de la secuencia del gene que codifica para la ALDH3A1 humana, cada oligonucleótido cuenta con un tamaño de 24 pares de bases (pb) (Tabla 3).

Tabla 3. Diseño de los cebadores de oligonucleótidos para la generación de las mutantes H3T242C y H3V244C.

	Cebadores	Secuencia de nucleótidos
H3T242C	Directo	5'- AGT GGC CAG TGC TGC GTG GCC CCA -3'
	Reverso	5'- TGG GGC CAC GCA GCA CTG GCC ACT -3'
H3V244C	Directo	5'- GGC CAG ACC TGC TGT GCC CCA GAC -3'
	Reverso	5'- GTC TGG GGC ACA GCA GGT CTG GCC -3'

Nota. Los codones modificados se muestran en negritas.

Obtención de las mutantes H3T242C y H3V244C.

Las mutaciones puntuales correspondientes a H3T242C y H3V244C se insertaron en el gene de ALDH3A1 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el método de extensión de primers internos (Horton et al., 1990). Como primer paso se obtuvieron los fragmentos forward y reverse con la mutación deseada, utilizando como DNA molde el gene de la ALDH3A1 en un volumen final de reacción de 50 µL. Una vez generados los fragmentos con la mutación, se realizó una reacción de traslape para obtener el gene completo que codificara para la enzima mutante. Los productos obtenidos de la reacción de PCR se visualizaron con bromuro de etidio en un gel de agarosa al 1%.

Concentración de reactivos para obtener los fragmentos por PCR

10x Amortiguador 10 mM Tris-HCl pH 8.3-8.....	1X
Desoxinucleotidotrifosfato (dNTPs).....	0.2 mM
DNA molde (ALDH3A1).....	250 ng
Cebador directo o reverso.....	850-950 pg
Oligonucleótido C-TER.....	900 pg
DNA Polimerasa (<i>Vent</i> polimerasa).....	2 U
H ₂ O estéril	

Concentración de reactivos para obtener el traslape

10x Amortiguador 10 mM Tris-HCl pH 8.3-8.8.....	1X
dNTPs.....	0.2 mM
DNA fragmento directo.....	250 ng
DNA fragmento reverso.....	250 ng
Cebador L2.....	900 pg
Cebador 6U-His.....	900 pg
DNA Polimerasa (<i>Vent</i> polimerasa).....	2 U
H ₂ O estéril	

Condiciones para PCR

1 ciclo	95°C	5 minutos			
39 ciclos	{	95°C	1 minuto	Desnaturalización	
		42.5-57.5°C	1 minuto		Alineamiento
		72°C	2 minutos		Extensión
1 ciclo	72°C	10 minutos			

Electroforesis en gel de agarosa (DNA)

Los productos de PCR obtenidos se separaron en un gel de agarosa al 1%. La agarosa se disolvió por calentamiento en amortiguador TAE (45 mM Tris, 45 mM de ácido acético, 1 mM EDTA) y se le añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 µg/mL. Las muestras se aplicaron en el gel ya solidificado y se corrieron a 90 volts durante 30 minutos. Se utilizó marcador de peso molecular de DNA de 1 kb (Marca New England BioLabs). Mediante esta técnica, los productos obtenidos se separan de acuerdo a su tamaño ya que el DNA está cargado negativamente y al aplicar un campo magnético este migra al polo positivo (ánodo). Los fragmentos de DNA se observaron con ayuda de un transiluminador de luz ultravioleta (UV), ya que el bromuro de etidio se intercala entre las bases de DNA y este fluoresce al exponerse a la luz UV.

Extracción de DNA a partir de geles de agarosa

Después de separar a los fragmentos de DNA correspondientes a la reacciones forward, reverse y el traslape en un gel de agarosa, estos se cortaron del gel y se procedió a purificarlos utilizando el kit de extracción y purificación de DNA GeneJET gel extraction kit (Thermo Scientific)[®], que consta de una solución de yoduro de sodio donde se disolvió el fragmento del gel que contenía el DNA de interés a 55°C por 10 minutos, posteriormente esta solución se transfirió a una columna de purificación y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, durante este tiempo el DNA se une fuertemente a la columna y mediante una centrifugación a 14,000 rpm durante 1 minuto se elimina en el sobrenadante, la solución salina y los residuos de agarosa. Posteriormente se adicionaron a la columna 700 µL de solución de lavado (NaCl/Tris/EDTA/Etanol) y se realizó una centrifugación a 14,000 rpm durante 1 minuto desechando el filtrado. Finalmente se eluyó el DNA con 30 µL de buffer de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) centrifugando a 14,000 rpm por 30 segundos. El filtrado, que contenía el DNA, se transfirió a un tubo limpio y estéril, para evitar contaminación por microorganismos que pudiesen degradar el DNA y/o interferir en los ensayos posteriores. El DNA

purificado se cuantificó espectrofotométricamente a $\lambda=260$ nm. A partir de la relación entre la concentración de ácidos nucleicos y la densidad óptica; de tal modo que 1 OD = 50 ng/ μ L de DNA de doble cadena.

Ligación al vector de sobreexpresión pT7-7-His

Una vez obtenido el DNA con las mutaciones correspondientes, se realizaron reacciones de restricción con las enzimas NdeI y HindIII, con el fin de generar extremos cohesivos y poder insertar las secuencias al vector de sobre-expresión pT7-7 previamente cortado con las mismas enzimas. Este vector, permite la expresión de proteínas recombinantes, ya que regula la expresión de la proteína de interés bajo el control del operon lac, además de que cuenta con el sistema de la T7 RNA polimerasa que permite la expresión de la proteína. En el diseño del gen, se adicionó a la proteína una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal, lo cual es una herramienta para su posterior purificación. La relación inserto-vector para la ligación fue 2:1.

Condiciones de la reacción de ligación.

Amortiguador de reacción para la T4 DNA ligasa.....	1X
Producto de PCR purificado (Inserto).....	0.5-1 μ g
Vector de sobreexpresión pT77-His.....	250 ng
T4 DNA ligasa.....	400 U

Incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Transformación en células DH5- α

Una vez realizada la reacción de ligación inserto-vector, se transformaron células de *Escherichia coli* de la cepa DH5- α , con el fin de amplificar las construcciones realizadas. Para esto, se utilizó el kit TransformAid Bacterial Transformation (Fermentas) que se basa en permeabilizar la membrana de las células con el fin

de introducir el plásmido. Un día antes de la transformación se inocularon 10 mL de medio LB (Triptona, Extracto de levadura y NaCl) con una colonia de *E. coli* DH5- α , y se incubó toda la noche a 37°C en agitación constante. El día de la transformación se preincubaron placas de agar suplementadas con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un tubo con medio C (1.5 mL para dos transformaciones) a 37°C por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 150 μL del cultivo de toda la noche al tubo de medio C preincubado y se incubó 20 minutos a 37°C con agitación constante. Después, se cosecharon las células centrifugando 1 minuto a 14,000 rpm y el botón se resuspendió en 150 μL de solución T (50% A y 50% B); posteriormente, la mezcla se incubó en hielo por 5 minutos, se cosecharon las células nuevamente centrifugando a 14,000 rpm durante 1 minuto, el paquete celular se resuspendió en 150 μL de solución T y se incubó en hielo por 5 minutos. Finalmente, se adicionaron de 10 μL de la reacción de ligación a la suspensión de células preparadas previamente y se incubó por 5 minutos a 4°C. Al término de este tiempo se extendieron las células inmediatamente en las placas de agar preincubadas y se incubó toda la noche a 37°C. Las colonias se seleccionaron por la resistencia a ampicilina, ya que el vector pT7-7 His contiene un gen que codifica para la enzima β -lactamasa que rompe el anillo β -lactámico de las penicilinas, lo que impide que el antibiótico ejerza su función en la célula.

Extracción de DNA a partir de cultivos bacterianos

Las colonias aisladas de la transformación, se inocularon en 10 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación constante (200 rpm). Posteriormente, se realizó la extracción del DNA plasmídico, para este fin se utilizó el kit SV minipreps DNA purification system (Promega). Un día antes de la extracción del DNA plasmídico, se inocularon 10 mL de medio LB adicionado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina, con una colonia de células de *Escherichia coli* de la cepa DH5- α que crecieron a partir de la transformación y que contenían el plásmido con el gen que codifica para la proteína de interés, el medio se incubó a 37°C y 200 rpm por toda la noche. Al día siguiente, se cosecharon las células centrifugando en tubos eppendorf a 14,000

rpm durante 1 minuto, el botón se resuspendió en 250 μL del siguiente amortiguador: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)/10 mM EDTA/100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ RNasa y se añadieron 250 μL de solución de lisis (0.2M NaOH/1% SDS) mezclando por inversión 4 veces. Posteriormente, se agregaron 10 μL de proteasa alcalina, se mezcló por inversión 4 veces y se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionaron 350 μL de solución de neutralización (4.09 M cloruro de guanidina/0.759 M acetato de potasio/ 2.12 M ácido acético glacial) mezclando por inversión 4 veces. Después se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se decantó dentro de la columna de purificación a la cual se une el DNA debido a la carga positiva que presenta el filtro, se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Se realizó un lavado adicional agregando 750 μL de solución de lavado (60% etanol/60 mM acetato de potasio/8.3 mM Tris-HCl (pH 7.5)/ 0.04 mM EDTA (pH 8.0)). Este paso se repitió adicionando 250 μL de dicha solución y nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos. Finalmente se eluyó el DNA plasmídico con 30 μL de buffer de elución (100 mM Tris-HCl (pH 7.5)/10 mM EDTA) centrifugando a 14000 rpm durante 1 minuto. El sobrenadante que contenía el DNA plasmídico, se transfirió a un tubo limpio y estéril, para evitar contaminación con microorganismos que pudiesen degradar el plásmido. Finalmente, se realizó el análisis de restricción y secuenciación, para verificar la identidad de nuestra clona.

Análisis de restricción

Una vez que se purificó el DNA plasmídico, se realizó una digestión con la enzima de restricción NcoI para la mutante H3T242C y con la enzima PstI para la mutante H3V244C, con el fin de verificar si las clonas seleccionadas contenían o no el inserto de interés (Figura 8). Las reacciones de restricción se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μL y se incubaron a 37°C por 2 horas. Al término del período de incubación las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 90 volts por 45 minutos.

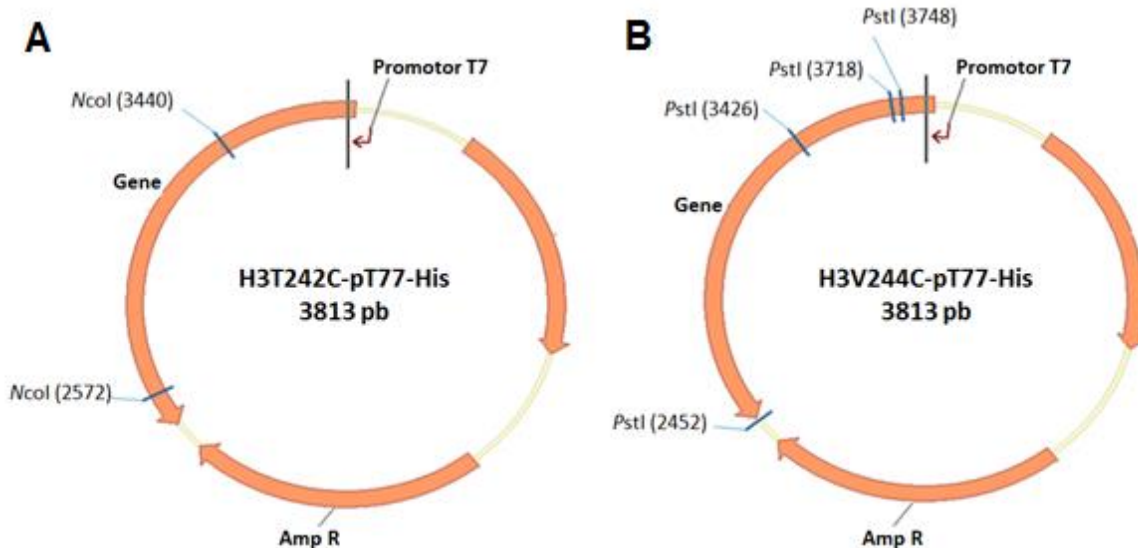


Figura 8. Construcción del plásmido con el vector de sobre-expresión pT77-His y el gen de la enzima mutante. A) La enzima NcoI genera dos fragmentos de 2945 pb y 868 pb; mientras que B) La enzima PstI genera tres fragmentos de 2517 pb, 1000 pb y el último de 292 pb.

Concentración de reactivos para la reacción de restricción

Amortiguador de reacción.....	1X
DNA plasmídico.....	2.5-5 µg
Enzima de restricción (NcoI/PstI).....	10/20 U
H ₂ O estéril cbp	20 µL

Análisis de secuenciación

Las construcciones de cada mutación, se enviaron a analizar por secuenciación automática, a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. La secuencia obtenida se comparó con la secuencia de nucleótidos descrita para el gen de la ALDH3A1 humana, con el fin de evidenciar que la construcción realizada, únicamente contara con la mutación esperada.

Obtención de células competentes

Una célula competente es aquella que por algún tratamiento físico o químico tiene permeable la membrana y por tanto es capaz de permitir la entrada de DNA exógeno. Para generar células competentes, se realizó un cultivo de medio LB con células de *Escherichia coli* de la cepa BL21, los cultivos se incubaron a 37°C en agitación constante durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron 500 µL del cultivo para inocular 50 mL de medio LB a 37°C hasta alcanzar una absorbancia entre 0.3 y 0.5 a 600 nm. Las células se cosecharon por centrifugación a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón fue resuspendido en 2 mL de CaCl₂ 0.1 M estéril a 4°C y luego se diluyó a 33 mL en la misma solución, dicha suspensión celular se incubó a 4°C durante 1 hora y nuevamente las células fueron cosechadas por centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos, finalmente el botón se resuspendió en 2 mL de una mezcla de CaCl₂ 0.1 M con glicerol estéril al 50%. Se tomaron alícuotas de 100 µL en tubos eppendorf estériles y se almacenaron en el ultracongelador a -70°C hasta su utilización.

Transformación en células competentes de E. coli de la cepa BL21

Después de realizar el análisis de la secuenciación, el plásmido obtenido de las células de *E. coli* DH5-α se mezcló con 50 µL de las células competentes *E. coli* cepa BL21 y se incubó en hielo durante media hora. Posteriormente se realizó un choque térmico a las células, incubando durante 2 minutos a 42°C, con el fin de permeabilizar la membrana. Las células se incubaron en hielo por 5 minutos para ser estabilizadas. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionó 1 mL de medio LB sin antibiótico y la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo las células se extendieron en una caja Petri con medio LB sólido (adicionado con agar al 15%, 100 µg/mL de ampicilina y 25 µg/mL de cloranfenicol). Las células transformantes se seleccionaron por la resistencia a dichos antibióticos.

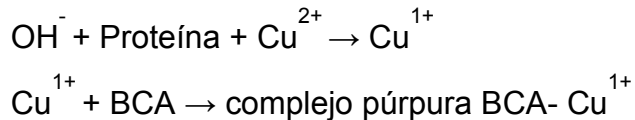
Expresión y purificación de la proteína recombinante

Se inocularon 10 mL de medio LB con una colonia de las células BL21 conteniendo el plásmido con el gen que codifica para la proteína de interés y se incubó toda la noche a 37 °C a 200 rpm. Con este precultivo se inoculó 1 L de medio 2XYT (compuesto de: 16 g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 5 g de cloruro de sodio en un litro de agua) y se incubó a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Posteriormente, se indujo la expresión de la proteína agregando IPTG a una concentración de 0.4 mM y se continuó la incubación toda la noche en agitación constante. Para la purificación de la enzima se cosecharon las células centrifugando a 4500 rpm durante 10 minutos y se realizaron 2 lavados con 100 mL de NaCl 0.9% cada uno. Las células se resuspendieron en un buffer conteniendo fosfato de sodio 50 mM pH 7.5, 500 mM NaCl y 20 mM 2-mercaptoetanol (buffer A), se rompieron por sonicación, utilizando un sonicador marca MSE, modelo Soniprep 150 a 100 MHz de potencia. Posteriormente el extracto celular se centrifugó a 45000 rpm durante 30 min y el sobrenadante resultante se inyectó en una columna de afinidad con níquel, equilibrada con buffer A a 4°C. La columna se lavó con 50 mL de buffer A suplementado con 50 mM de imidazol y la proteína se eluyó de la columna mediante un gradiente lineal de imidazol de 50-500 mM en un volumen final de 100 mL. La proteína pura se concentró utilizando filtros amicon de límite de exclusión de 30 KDa, se lavó con buffer de fosfato de sodio 100 mM pH 7.4, a 4°C y se guardó en 50% de glicerol a -20°C hasta su utilización.

Cuantificación de la proteína

Previo a la cuantificación de la proteína purificada, se eliminaron agentes que pudieran interferir con la determinación. Para ello, se tomó una alícuota de 50 µL de la enzima en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se precipitó con TCA al 13% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió

en una solución de NaOH 0.1N y 5% de SDS, en un volumen final de 50 μ L. La cuantificación se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), cuyo fundamento se basa en la formación de un complejo purpura intenso, al reaccionar el ácido bicinconínico con iones Cu^{1+} en un medio alcalino. Este reactivo, forma la base de un método analítico capaz de monitorear el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino.



Se preparó una curva patrón con diferentes concentraciones de albumina de suero bovino (BSA) (5-100 μ g de proteína total), posteriormente se añadieron 2 mL de la mezcla de reacción (Mezcla del reactivo A; 750 mM carbonato de sodio/87 mM tartrato de sodio/120 mM BCA/pH 11.25 y del reactivo B; 3.6 mM sulfato cuproso) a los tubos de la curva patrón y a las muestras problema. Los tubos se incubaron 15 min a 60 °C y se evaluó la absorbancia a 562 nm.

Electroforesis de la proteína en geles de poliacrilamida-SDS

Para realizar el seguimiento de la purificación, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS para separar proteínas con respecto a su peso molecular en condiciones desnaturizantes, de acuerdo al método descrito por Laemmli en 1970. En este método, el SDS desnaturiza a las proteínas y les confiere carga neta negativa, de esa manera, las proteínas migran hacia el ánodo y se separan únicamente por su peso molecular. Para esto, se prepararon geles desnaturizantes de poliacrilamida-SDS; gel separador: 10% solución acrilamida-bisacrilamida (29:1)/0.5 M Tris pH 8.8/0.1% SDS/0.05% TEMED/0.05% APS; gel concentrador: 5% solución acrilamida-bisacrilamida (29:1)/0.1 M Tris pH 6.8/0.1% SDS/0.07% TEMED/0.07% APS. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga (50 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glicerol, 0.1% azul de bromofenol, y 100 mM DTT), en proporción 1:1 y se hirvieron durante 5 minutos. El gel se corrió a

150 volts por 45 minutos en el amortiguador de corrida que contiene: 250 mM Tris-HCl/192 mM glicina/0.1% SDS. Una vez concluida la electroforesis, el gel se tiñó con azul de Coomassie al 0.05% en una mezcla de metanol al 50% y ácido acético al 10%. Posteriormente, se destiñó con una mezcla de ácido acético al 10% y metanol al 50% en agua.

Determinación de pureza de la proteína

El porcentaje de pureza de las proteínas recombinantes se determinó realizando un análisis densitométrico del gel, con ayuda del programa ImageJ (disponible en <http://imagej.nih.gov/ij/>).

Análisis cinético

Caracterización cinética

La actividad enzimática de ALDH se determinó en un amortiguador de pirofosfato de sodio 100 mM (pH 9.5) y en amortiguador de fosfato de sodio 100 mM (pH 7.4), a 25°C, en presencia de 300 μ M de NAD⁺. La reacción se inició con la adición del aldehído correspondiente. La actividad enzimática de ALDH se determinó en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800) siguiendo la absorbancia a 340 nm, debida al NADH generado durante la reacción. Los resultados se analizaron por regresión no lineal usando la ecuación de Michaelis-Menten y realizando el correspondiente gráfico de dobles recíprocos de los datos obtenidos. Para dicho análisis se utilizó el software Microcal Origin v.8.0.

Evaluación de susceptibilidad a acroleína

Para determinar la susceptibilidad que presentan la ALDH3A1, la H3T242C y la H3V244C a acroleína, se incubaron 5-10 μ g de proteína en 100 μ L de amortiguador de fosfato de sodio 100 mM pH 7.4 a diferentes concentraciones de acroleína (0.05 - 1 mM) durante 5 minutos. Al término de este tiempo la enzima se

diluyó 10 veces en el amortiguador de actividad y se evaluó la actividad remanente en presencia de 300 μM de NAD^+ y 200 μM de benzaldehído. Finalmente con el fin de evaluar el efecto de protección que ejercen los sustratos respecto al daño producido por la acroleína, se incubaron 5-10 μg de proteína en presencia de NADH 1 mM y/o benzaldehído 6 mM a diferentes concentraciones de acroleína a pH 7.4. Los resultados se analizaron tomando en cuenta que el 100% de actividad corresponde a la actividad remanente de la enzima, después de incubarla por 5 minutos en ausencia de éste aldehído tóxico.

Resultados

Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de oligonucleótidos, primero se realizó un análisis de la secuencia de aminoácidos en el sitio de unión del aldehído de la enzima ALDH3A1, con el fin de identificar los residuos que se intercambiarían por cisteínas y la posición de estos en las mutantes de la ALDH3A1. En la Figura 9 se puede observar que en la mutante H3T242C se cambió una treonina en la posición 242, mientras que en la mutante H3V244C se cambió una valina en la posición 244.

	225		243		254
ALDH3	CRRIAWGKF-	--MNSGQTCV	APDYILCDPS		
H3T242C	CRRIAWGKF-	--MNSGQCCV	APDYILCDPS		
H3V244C	CRRIAWGKF-	--MNSGQTC	APDYILCDPS		

Figura 9. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos del sitio de unión del aldehído, de la ALDH3A1 silvestre con las mutantes H3T242C y H3V244C. En el recuadro se observa la cisteína reactiva en la posición 243 en color rojo y en las mutantes, marcadas en verde se muestran las cisteínas 242 y 244.

Obtención y amplificación de los genes

A partir de la secuencia reportada del gen de la ALDH3A1 humana, se diseñaron oligonucleótidos en sentido directo y reverso que incluyeran el cambio de una treonina por una cisteína en la posición 242 para generar la mutante ALDH3-Thr-242Cys (H3T242C) y otros que incluyeran el cambio de una valina por una cisteína en la posición 244, para generar la mutante ALDH3-Val244Cys (H3V244C). Se realizaron las reacciones de PCR correspondientes a través de la técnica de extensión de primers internos, con el fin de amplificar los dos fragmentos requeridos con las mutaciones en el sitio de interés. El fragmento directo se generó desde el inicio del gene, hasta el sitio de la mutación; mientras

que el fragmento reverso, se generó desde el sitio de la mutación hasta el extremo C-terminal del gene. En la mutante H3T242C, los fragmentos generados fueron de 987bp (directo) y 769bp (reverso) (Figura 10A y 10B). En el caso de la mutante H3V244C, los fragmentos obtenidos fueron de 975 pb para la reacción directa y de 778 pb para la reacción reversa (Figura 11A y 11B).

Tras haber obtenido los fragmentos (directo y reverso) de cada una de las mutantes, se realizó el traslape de estos y se amplificó el gene completo correspondiente a 1756 pb, para ambas mutantes (Figuras 10C y 11C).

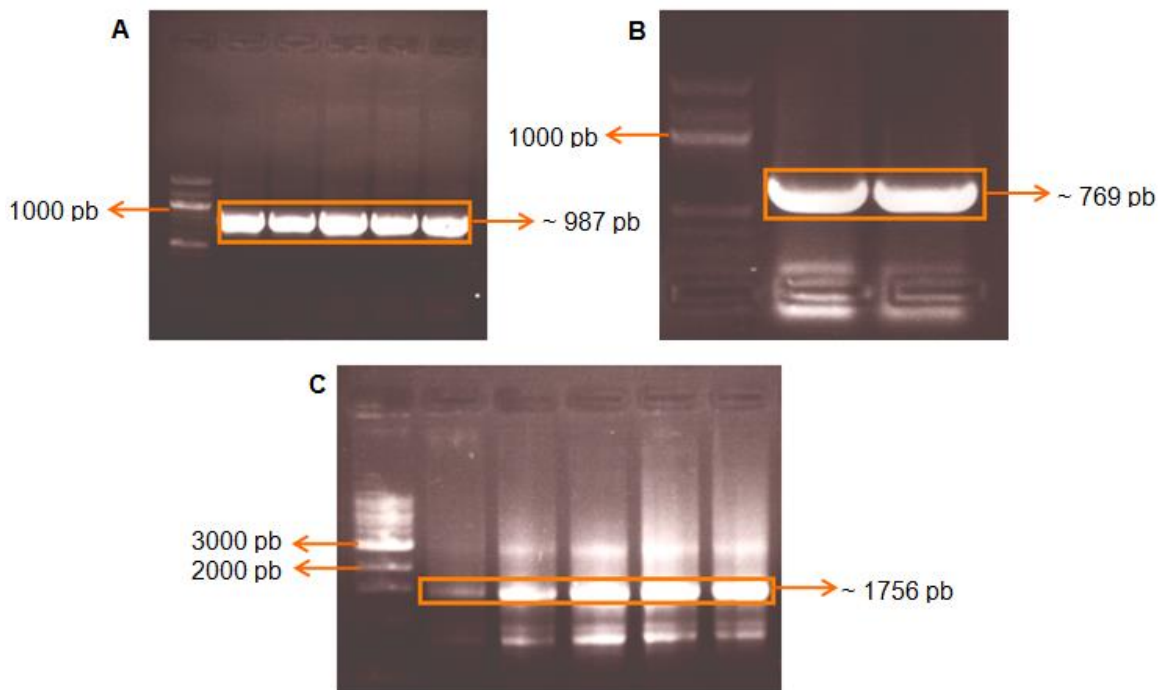


Figura 10. Resultados del análisis de electroforesis de los productos de las reacciones de PCR, para la obtención de la mutante H3T242C. (A) Fragmento directo, 967 pb; (B) Fragmento reverso, 769 pb; y (C) Amplificación del gen completo de la mutante, 1756 pb. El primer carril de cada figura corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb.

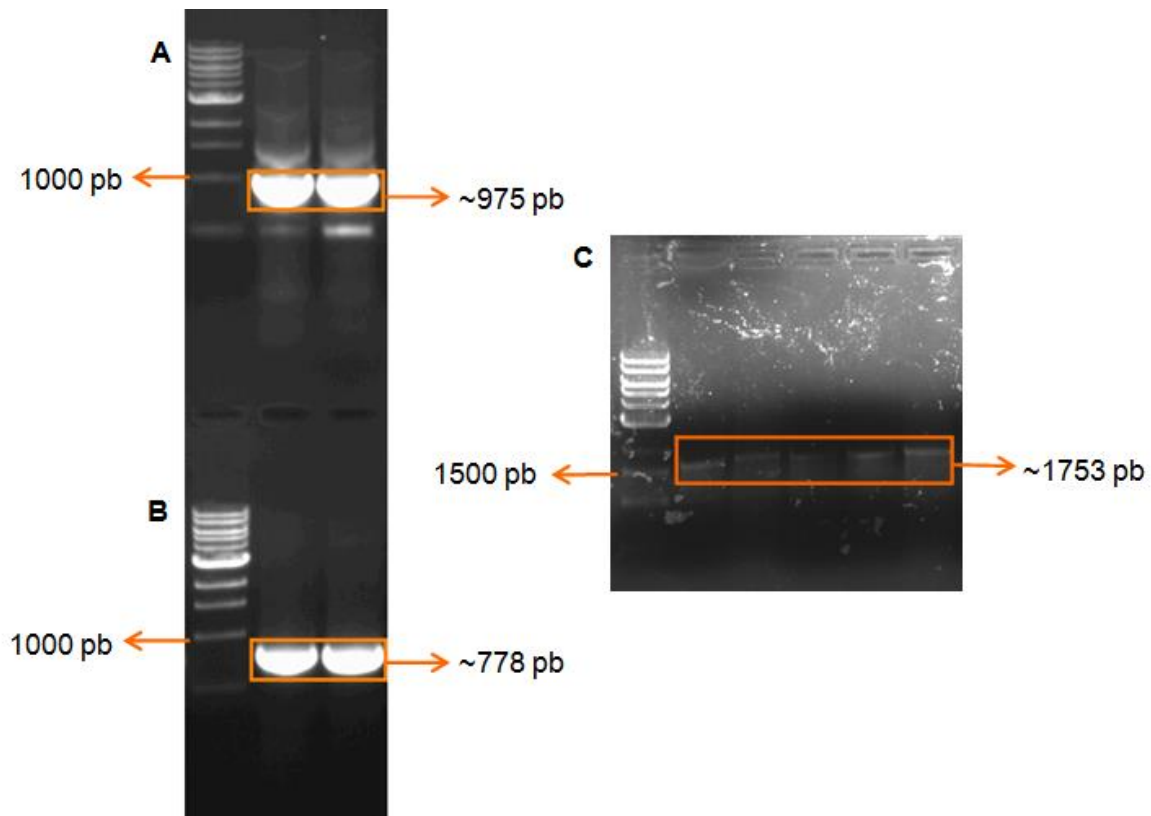


Figura 11. Resultados del análisis de electroforesis de los productos de las reacciones de PCR, para la obtención de la mutante H3V244C. (A) Fragmento directo, 975 pb; (B) Fragmento reverso, 778 pb; y (C) Amplificación del gen completo de la mutante, 1753 pb. El primer carril de cada figura corresponde al marcador de peso molecular de 1 Kb.

Ligación del gene al vector de clonación y transformación en células DH5- α

El inserto de DNA obtenido por traslape de los fragmentos directo y reverso en la reacción de PCR, se purificó del gel y se cortó con las enzimas de restricción HindIII y NdeI para ligarlo al vector de sobre expresión pT7-7-His. Posteriormente, se transformaron células de *Escherichia coli* de la cepa DH5- α para obtener suficientes copias del plásmido con el gen de interés. Para seleccionar las clonas que contuvieran el plásmido, la mezcla de transformación se extendió en cajas con medio LB más ampicilina, de tal forma que solo crecieran las clonas que contenían

plásmido. La selección se da por resistencia a la ampicilina, ya que el plásmido contiene el gene que codifica para la enzima β -lactamasa, la cual rompe el anillo β -lactámico de los antibióticos de la familia de las penicilinas y cefalosporinas.

De las colonias que crecieron a partir de la transformación en células DH5- α , se sembraron 3 en medio LB líquido con ampicilina (100 μ g/mL) para purificar los plásmidos. De estos, se realizó un análisis de restricción para identificar los plásmidos que contuvieran el inserto correspondiente al gene con la mutación. La identidad de la mutante H3T242C se evaluó a partir de una digestión con la enzima NcoI, generando dos fragmentos de 2945 pb y otro de 868 pb; mientras que la identidad de la mutante H3V244C se evaluó con la enzima de restricción PstI, generando tres fragmentos de DNA correspondientes a 2517 pb, 1000 pb y 292 pb, respectivamente. En la figura 12 se puede observar que el análisis de restricción fue exitoso para ambas mutantes. Lo que nos indica que los plásmidos contienen el gen de interés.

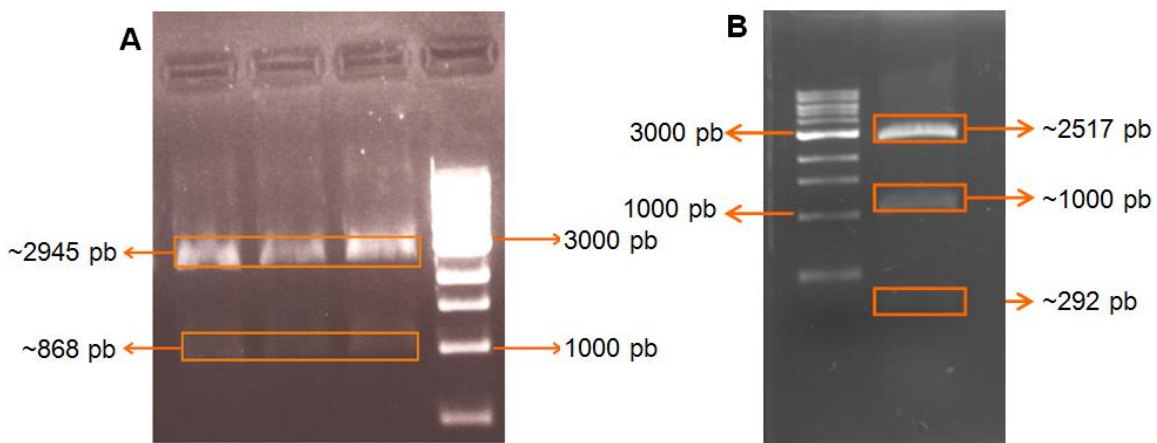


Figura 12. Análisis de restricción de los plásmidos. (A) Digestión de los plásmidos correspondientes a la mutante H3T242C con la enzima de restricción NcoI. (B) Digestión del plásmido correspondiente a la mutante H3V244C con la enzima de restricción PstI. En los recuadros se muestran las bandas con los fragmentos generados después de la restricción y en el primer carril la migración del marcador de peso molecular de 1Kb.

Análisis de la secuencia de aminoácidos

De las clonas positivas en el análisis de restricción, se seleccionó una, la cual se sometió a secuenciación automática de nucleótidos. La secuencia obtenida se tradujo a secuencia de aminoácidos y se comparó con la reportada para el gen de la ALDH3A1 humana.

De la comparación de ambas mutantes con la secuencia de ALDH3A1 se obtuvo un 99.8% de identidad. Este porcentaje se debe al cambio del aminoácido deseado para cada una de las enzimas mutantes; una treonina por una cisteína en el caso de la mutante H3T242C y una valina por una cisteína en el caso de la mutante H3V244C (Figura 13).

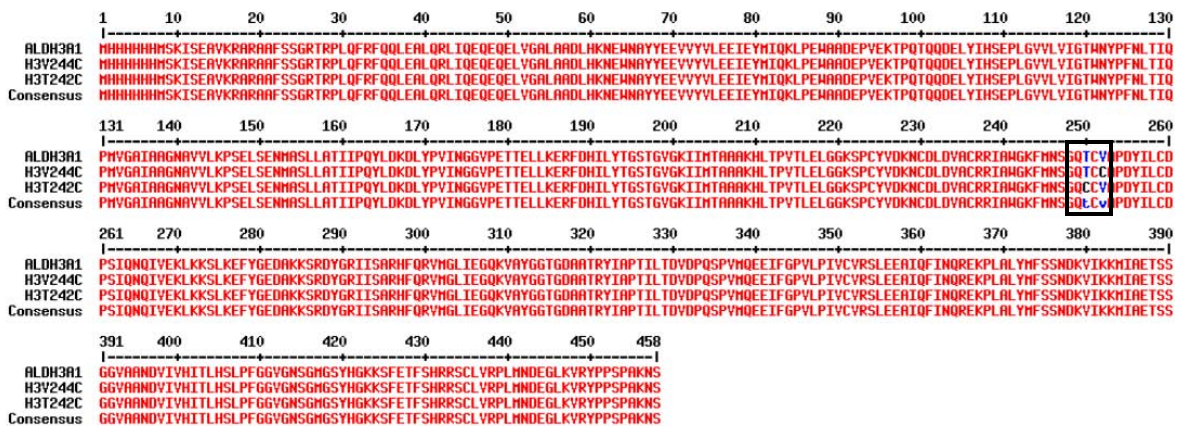


Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las enzimas mutantes H3T242C y H3V244C con ALDH3A1. Dentro del recuadro, en azul se muestran los residuos cambiados en las mutantes.

Sobreexpresión y purificación de las enzimas recombinantes

En la Figura 14 se presenta el análisis de los diferentes pasos del proceso de purificación de las mutantes H3T242C y H3V244C en un gel desnaturalizante de acrilamida. Se puede observar que la proteína recombinante se encuentra principalmente en la fracción soluble del extracto y no en el precipitado, esto indica

que no hay una pérdida significativa de la proteína durante el proceso de purificación y nos asegura obtener un buen rendimiento de la enzima.

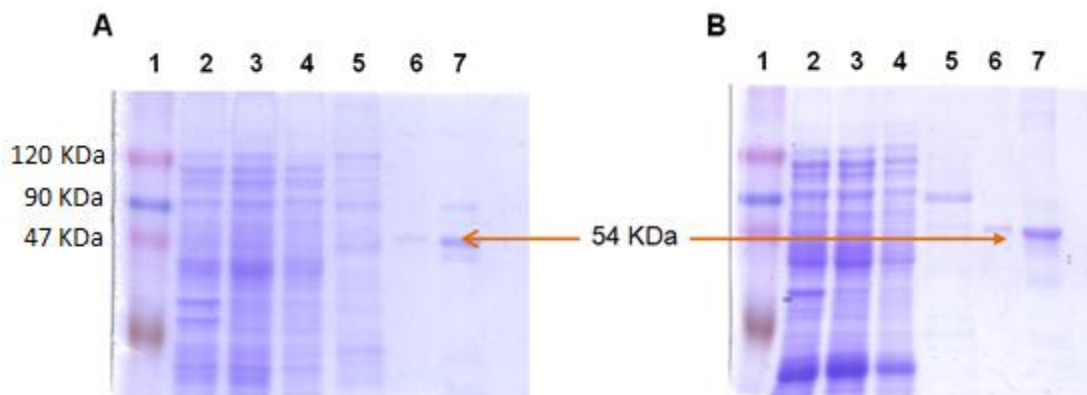


Figura 14. Marcha de purificación de las mutantes generadas. (A) Mutante H3T242C. (B) Mutante H3V244C. Carril 1; marcador de peso molecular. Carril 2; fracción insoluble (botón). Carril 3; fracción soluble (sobrenadante). Carril 4, 1er. Lavado (amortiguador de equilibrio de la columna). Carril 5, 2do Lavado (imidazol 100 mM). Carril 6, Gradiente de imidazol. Carril 7, enzima purificada y concentrada.

Para obtener el porcentaje de pureza de la enzima, se realizó un densitograma del gel, tomando en cuenta todas las bandas presentes en el carril que presenta la enzima concentrada. El análisis reveló que ambas proteínas presentaron 90% de pureza, por lo cual el valor de actividad obtenido posteriormente se corrigió de acuerdo a esta pureza para evitar la subestimación de los datos.

Determinación de los parámetros cinéticos

Una vez purificada la enzima, se determinaron los parámetros cinéticos (K_m , V_{max}) por benzaldehído y NAD^+ a pH 7.4. En la Figura 15, se observa el perfil cinético de las diferentes enzimas al variar la concentración de aldehído, manteniendo fija la concentración de NAD^+ ; mientras que en la Figura 16 se presenta el perfil obtenido al variar el NAD^+ y mantener fija el aldehído. Las curvas en ambos casos, presentan un comportamiento hiperbólico ajustándose al modelo

matemático de Michaelis-Menten (los parámetros cinéticos se presentan en la Tabla 4). Al realizar el gráfico de los dobles recíprocos (Lineweaver-Burk), los puntos se ajustan a la ecuación de la línea recta, permitiendo calcular los valores de K_m y V_{max} para cada sustrato. Este gráfico también nos ayuda a visualizar la presencia de un solo componente en la cinética de la enzima pues los puntos se ajustan a una sola tendencia.

La ALDH3A1 presentó un valor de K_m por benzaldehído de 0.2 mM a pH de 7.4, este valor se incrementó 4 veces en las enzimas mutantes, disminuyendo de esta forma la afinidad por este sustrato. Con respecto al valor de K_m por NAD^+ , éste no se modificó, siendo de 30 μM para la enzima silvestre y las enzimas mutantes. Este resultado indica, que no hubo modificación en el sitio de unión del NAD^+ al realizar las mutaciones en el sitio de unión al aldehído. Por otro lado, la actividad de las mutantes disminuyó alrededor de 3 y 14 veces para H3T242C y H3V244C, respectivamente, comparados con la enzima silvestre. Los parámetros cinéticos correspondientes a cada sustrato se presentan en la Tabla 4.

Los ensayos cinéticos también se realizaron a pH 9.5, pues a este pH los residuos de cisteína en el sitio de unión del aldehído se encuentran desprotonados (cargados negativamente), por lo cual, son más susceptibles de reaccionar con los aldehídos. En las Figuras 17 y 18 se presentan los perfiles cinéticos obtenidos para el NAD^+ y el benzaldehído. En esta condición no se modificaron los valores de K_m por la coenzima, respecto a los valores obtenidos a pH 7.4, para cada enzima, pero para H3T242C y H3V244C disminuyó la afinidad por el benzaldehído en comparación con ALDH3A1. Así mismo, la actividad de las mutantes disminuyó alrededor de 3 y 20 veces para H3T242C y H3V244C, respectivamente, comparados con la enzima silvestre (Tabla 4). A pH 9.5 la V_{max} , disminuyó a la mitad para las tres enzimas, comparando este valor con el obtenido a pH 7.4 (Tabla 4). El cambio en la V_{max} , puede deberse a que el pH óptimo determinado para ALDH3A1 es de 8.2.

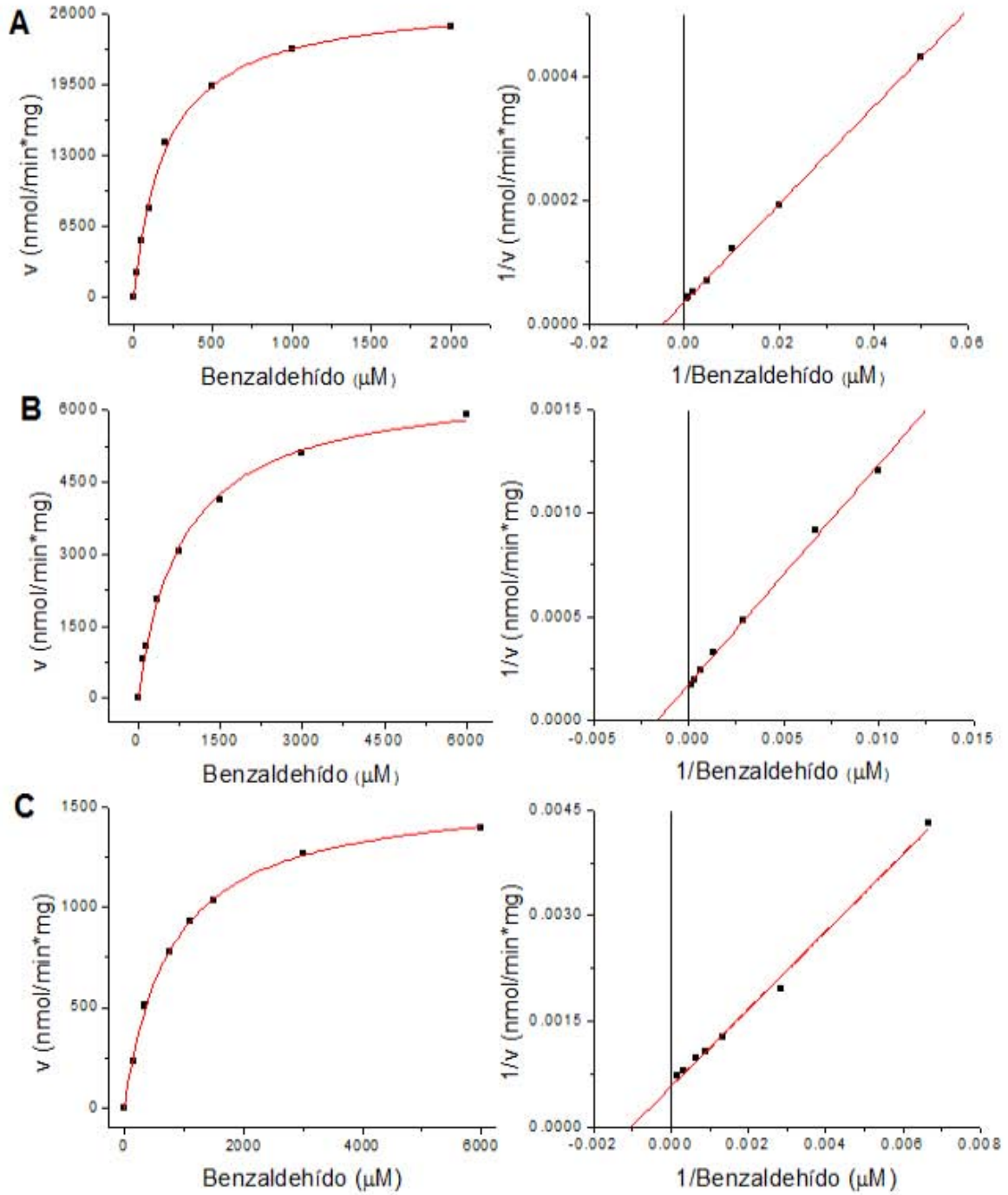


Figura 15. Perfil cinético de las enzimas al variar el benzaldehído a pH 7.4, (A), ALDH3A1; (B), mutante H3T242C y (C), mutante H3V244C.

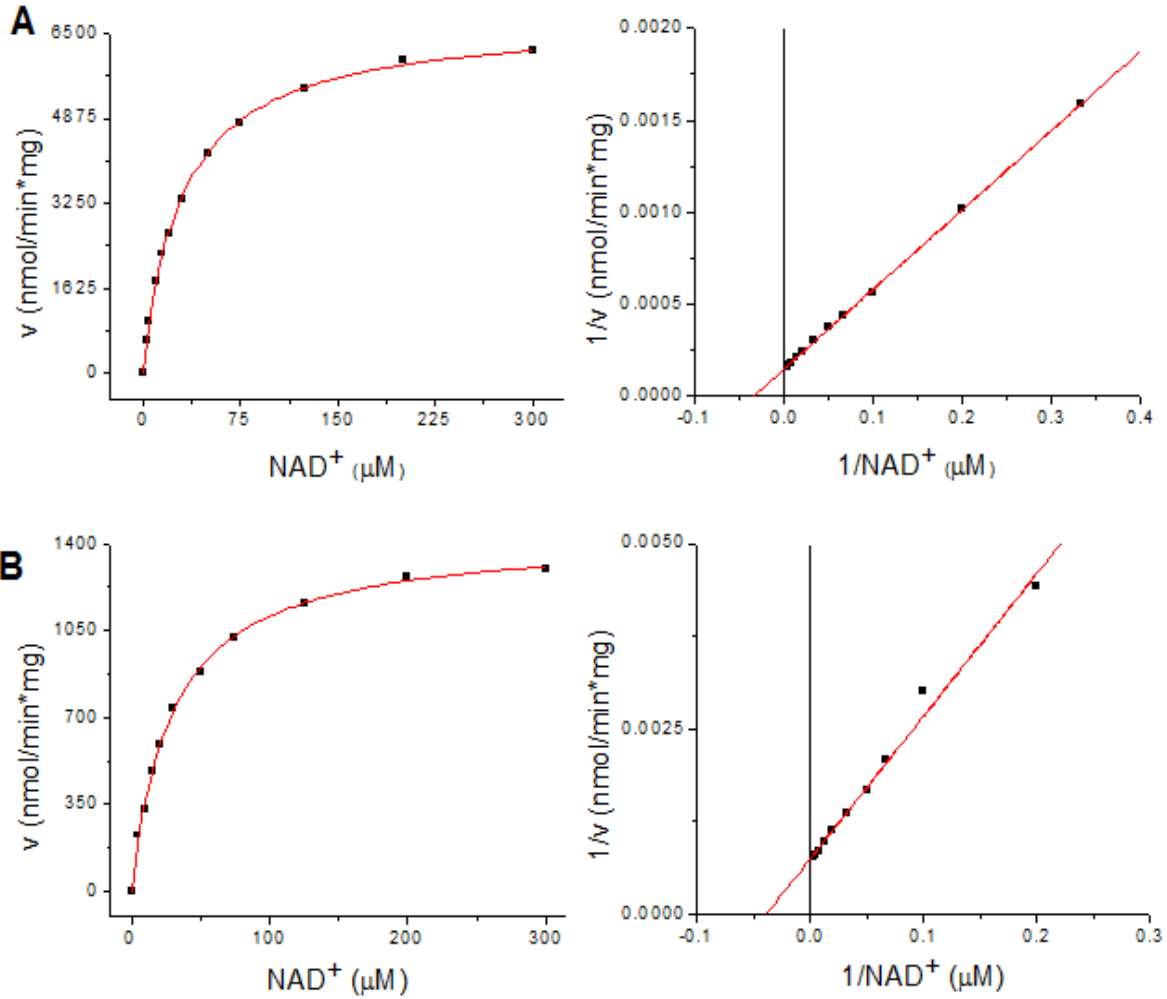


Figura 16. Perfil cinético de las enzimas mutantes con NAD^+ a pH 7.4. (A), mutante H3T242C; (B), mutante H3V244C.

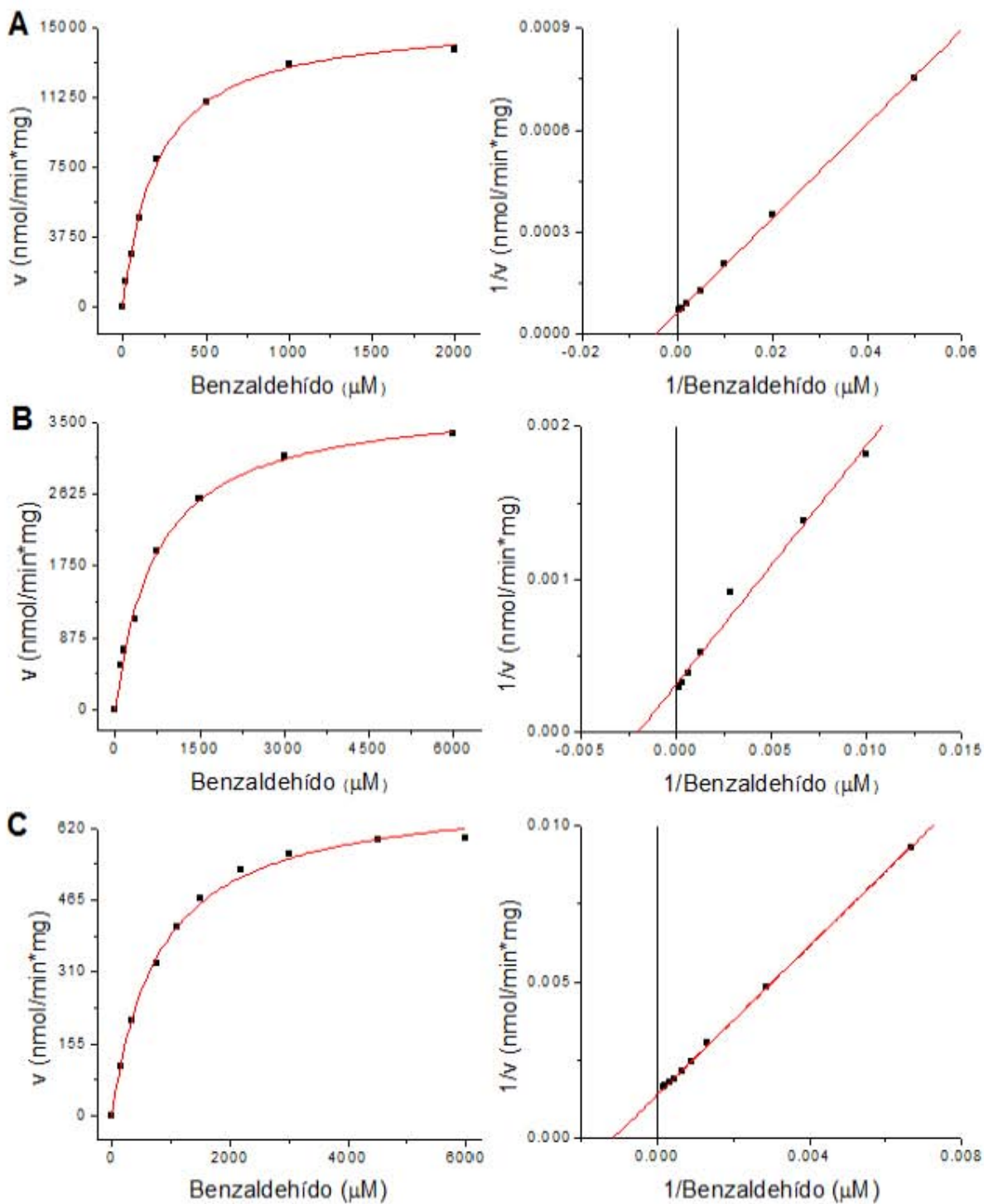


Figura 17. Perfil cinético de las enzimas al variar el benzaldehído a pH 9.5. (A), ALDH3A1; (B), mutante H3T242C y (C), mutante H3V244C.

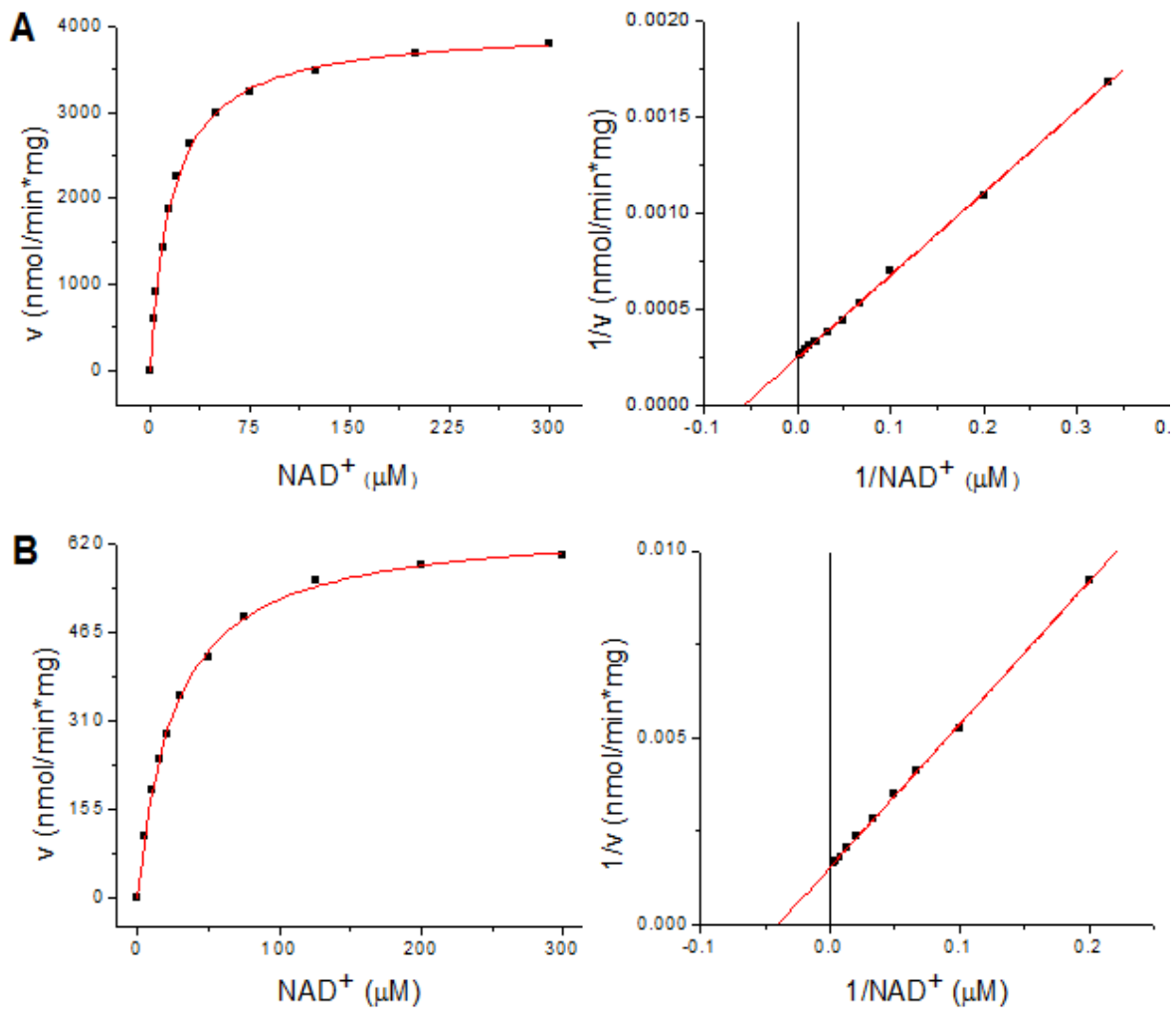


Figura 18. Perfil cinético de las enzimas mutantes con NAD^+ a pH 9.5. (A) mutante H3T242C; (B) mutante H3V244C.

Tabla 4. Parámetros cinéticos calculados para ALDH3 y las mutantes con benzaldehído.

	pH	<i>K_m</i> (mM)		<i>V_{max}</i> (nmol/min*mg)	<i>V_{max}/K_m</i>
		Benzaldehído	NAD ⁺	Benzaldehído	Benzaldehído
ALDH3	7.4	0.2 ± 0.02 0.2 ^a	0.03 ^a	21202 ± 6221	105 ± 23
	9.5	0.17 ± 0.04 0.2 ^a	0.03 ^a	11877 ± 1294	71 ± 13
H3T242C	7.4	0.93 ± 0.18	0.029 ± 0.004	7166 ± 504	8.12 ± 1.85
	9.5	0.86 ± 0.36	0.027 ± 0.002	4359 ± 163	7.55 ± 1.81
H3V244C	7.4	0.78 ± 0.05	0.03 ± 0.009	1471	1.9
	9.5	0.76 ± 0.04	0.027 ± 0.005	615	0.8

^a **Datos Reportados; n= 2,4**

Una vez realizado el análisis cinético por benzaldehído y NAD⁺, se determinaron los parámetros cinéticos por acroleína (uno de los aldehídos producto de la peroxidación lipídica) y se evaluó la susceptibilidad de las enzimas a este aldehído tóxico. Los resultados revelaron que la ALDH3A1 resiste concentraciones de hasta 20 mM de acroleína, tanto a pH 7.4, como a pH 9.5 (Figuras 19A y 20A); tal como se había reportado previamente (Yoval-Sánchez et al., 2012). La mutante H3T242C comenzó a inactivarse a una concentración de acroleína de 11 mM a pH 7.4; mientras que a pH 9.5, la inactivación comenzó a partir de 7 mM (Figuras 19B y 20B). Por otra parte, la enzima mutante H3V244C, también fue más susceptible a acroleína al compararse con la enzima silvestre, pues ésta comenzó a inactivarse a partir de 2 mM de acroleína y perdió 50 y 100% de su actividad en presencia de 5 y 10 mM de este aldehído, respectivamente, a pH de 7.4 (Figura 19C). Además, a pH de 9.5 no se detectó actividad de esta enzima con acroleína, lo cual indica que esta mutante en particular se inactiva a concentraciones menores a 1 μM de este aldehído lipídico.

El hecho de que ambas mutantes de ALDH3A1 se inactiven en presencia de acroleína, indica que las cisteínas adyacentes a la cisteína catalítica son los residuos blanco de la inactivación por aldehídos producto de la lipoperoxidación, tal y como se planteó en la hipótesis de este trabajo. Este efecto, se hace más evidente a pH de 9.5, donde el grupo sulfhidrilo de la cisteína se encuentra ionizado y por lo tanto, es más susceptible a reaccionar con los aldehídos. En el caso de la ALDH3A1, los perfiles cinéticos obtenidos se ajustaron al modelo matemático de Michaelis-Menten, pero, en el caso de las enzimas mutantes, los datos se ajustaron a un modelo de inhibición por sustrato, en donde la enzima, va perdiendo actividad a concentraciones crecientes de acroleína. Al analizar los parámetros cinéticos, se observó que el valor de K_m por acroleína para la mutante H3T242C se incrementó 2 veces, al compararse con la ALDH3A1, reflejando una disminución en la afinidad por este sustrato. El efecto contrario se observó en la enzima H3V244C, cuyo valor de K_m por acroleína disminuyó 3 veces, comparada con la enzima silvestre, aumentando de este modo la afinidad por dicho sustrato (Ver tabla 5).

Tabla 5. Parámetros cinéticos calculados para ALDH3 y las mutantes con acroleína.

	pH	K_m (mM)	V_{max} (nmol/min*mg)	V_{max}/K_m
		Acroleína	Acroleína	Acroleína
ALDH3	7.4	1.27 ± 0.27 0.92 ^a	1308 ± 254 1203 ^a	1.03 ± 0.14 1.06 ^a
	9.5	2.47 ± 0.21 2.42 ^a	2088 ± 385 1892 ^a	0.84 ± 0.09 0.81 ^a
H3T242C	7.4	2.34 ± 0.21	1743 ± 440	0.83 ± 0.12
	9.5	2.76 ± 0.39	5934 ± 688	2.16 ± 0.08
H3V244C	7.4	0.57 ± 0.01	479 ± 71	0.8 ± 0.1
	9.5	ND	ND	ND

^a Datos Reportados; ND; < 1 nmol/min*mg; n= 2,4

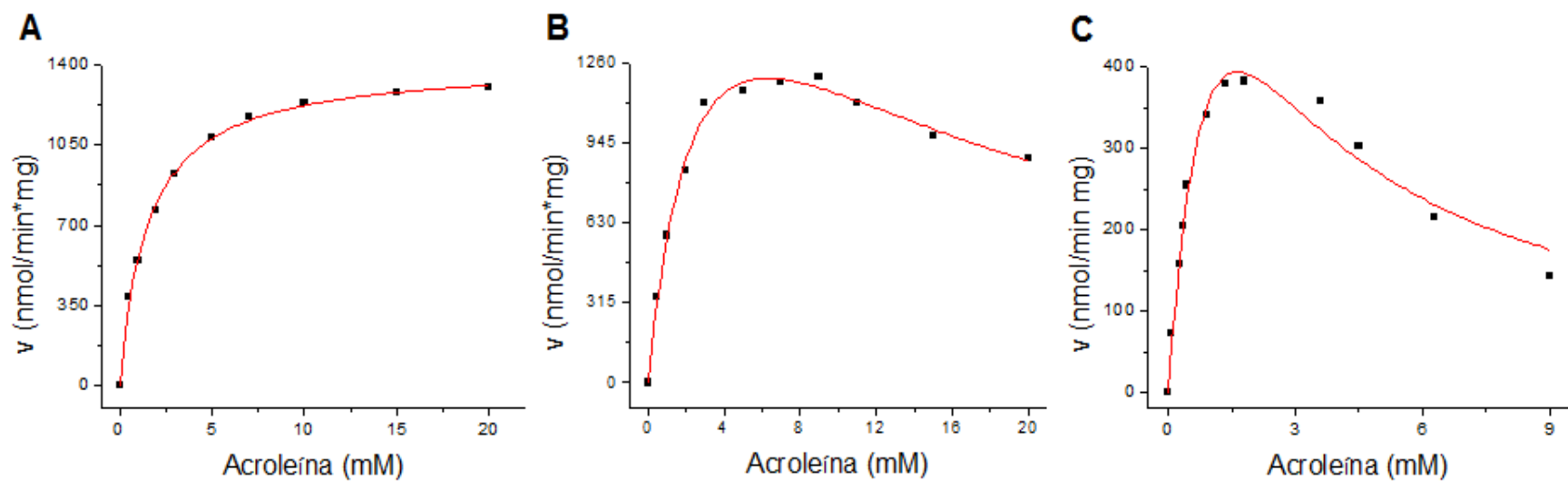


Figura 19. Perfiles cinéticos de las enzimas en presencia de acroleína a pH 7.4. (A), ALDH3A1; (B), H3T242C y (C), H3V244C.

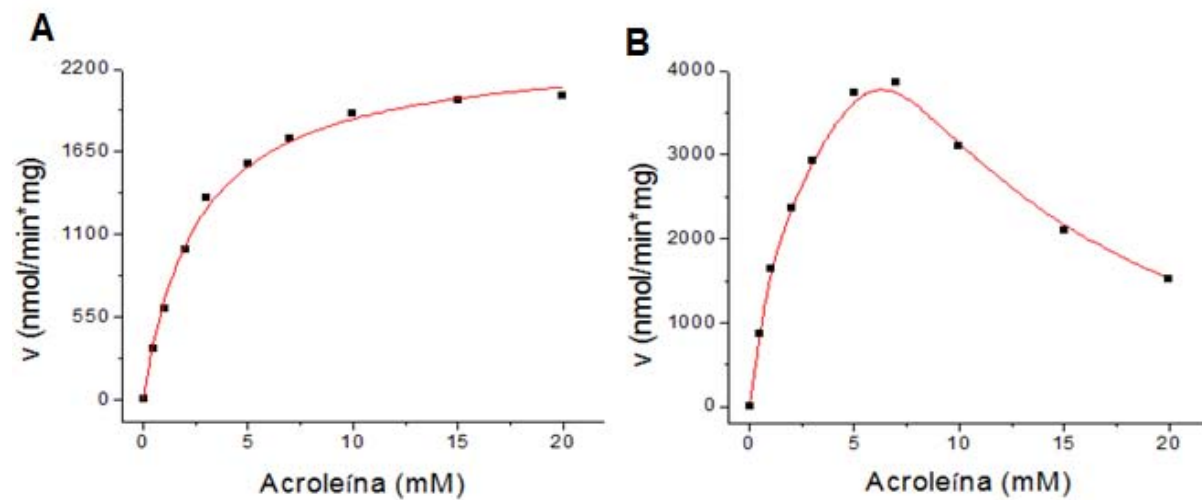


Figura 20. Perfiles cinéticos de las enzimas en presencia de acroleína a pH 9.5. (A), ALDH3 y (B), H3T242C.

Para evaluar más adecuadamente la susceptibilidad de las enzimas a acroleína, se realizó un perfil de inactivación de éstas, incubando a la enzima con este aldehído por 5 minutos y midiendo la actividad remanente al término del tiempo de incubación. Los resultados revelaron que la ALDH3A1 comenzó a inactivarse a partir de 100 μM de acroleína, alcanzando el 50% de inactivación en presencia de 1 mM de este aldehído. En el caso de las mutantes H3T242C y H3V244C, éstas comenzaron a inactivarse a partir de 1 μM de acroleína, conservando únicamente el 30 y 10% de su actividad en presencia de 1 mM de acroleína, respectivamente (Figura 21).

Posteriormente, se evaluó el efecto de protección que podrían ejercer el NADH y el benzaldehído sobre los sitios activos de la proteína (sitio de unión del NAD^+ y sitio de unión del aldehído) ante la inactivación por acroleína. A este respecto, se observó que 1 mM de NADH no ejerció efecto protector sobre las enzimas, al contrario, se perdió el 50, 60 y 90% de actividad para ALDH3A1, H3T242C y H3V244C, respectivamente, cuando se expusieron a 1 mM de acroleína (Figura 21). Estos datos se pueden atribuir a la modificación del sitio catalítico inducida por el NADH, pues se ha determinado que la unión del NAD^+ a su sitio catalítico además de disminuir el pK_a de la Cys reactiva para llevar a cabo la catálisis, induce un cambio conformacional en el sitio de entrada del aldehído, favoreciendo el acceso del sustrato a su sitio (Marchal et al., 1999). Por lo tanto, el NADH al ser un análogo del NAD^+ , promueve este mismo efecto y por consiguiente expone al sitio de unión del aldehído a la acroleína, propiciando la formación de aductos proteína-acroleína e inactivando fuertemente la enzima. Es importante remarcar que no hay catálisis enzimática con el NADH, ya que es un producto de la reacción y ésta no es reversible.

De manera sorprendente, la incubación con 2 mM de benzaldehído no tuvo ningún efecto protector sobre la inactivación enzimática de ALDH3A1, H3T242C o H3V244C (Figura 21). El hecho de que el benzaldehído no proteja de la inactivación ejercida por la acroleína se puede deber a la ausencia de la coenzima (NAD^+/NADH) al inicio del ensayo, pues el NAD^+ es el primer sustrato en la

reacción y al unirse a su sitio catalítico, favorece la entrada del aldehído debido a un cambio conformacional; el benzaldehído, al ser un compuesto aromático presenta un mayor impedimento estérico, lo cual dificulta su acceso al sitio catalítico, comparado con la acroleína que es un aldehído alifático de cadena corta (3 carbonos). De este modo, la acroleína puede entrar más fácilmente al sitio de unión y empezar a formar aductos. Otra explicación al nulo efecto protector del benzaldehído, sería que ahora la acroleína al ser un aldehído pequeño, está entrando por el sitio de unión al NAD^+ (ya que el sitio de unión del aldehído está comunicado con el sitio de unión del NAD^+ mediante un túnel), formando aductos con las cisteínas presentes en el sitio de unión al aldehído.

Finalmente, se determinó el efecto que ejerce la presencia de ambos sustratos (NADH y benzaldehído) sobre la inactivación de la enzima por acroleína. En la ALDH3A1 la adición conjunta de estos sustratos proporcionó una protección del 100% sobre la actividad enzimática. En la mutante H3T242C la presencia de ambos sustratos en el medio, favoreció su protección, pues esta enzima conservó el 80% de la actividad en presencia de 1 mM de acroleína; recuperando el 40% de la actividad respecto a la enzima incubada sin los sustratos (Figura 21B). De igual forma, en la mutante H3V244C se observó el 50% de la actividad remanente al incubar la enzima con ambos sustratos, recuperando un 30% de la actividad al comparar con la enzima incubada solamente con acroleína (Figura 21C).

La protección ejercida por la adición conjunta de los sustratos al medio de incubación, sugiere ampliamente que el blanco de inactivación se encuentra en el sitio catalítico de la enzima, pues al unirse cada sustrato a su sitio correspondiente, se restringe parcialmente la entrada de la acroleína al interior del embudo catalítico, evitando la formación de aductos con las cisteínas expuestas en el sitio de unión al aldehído.

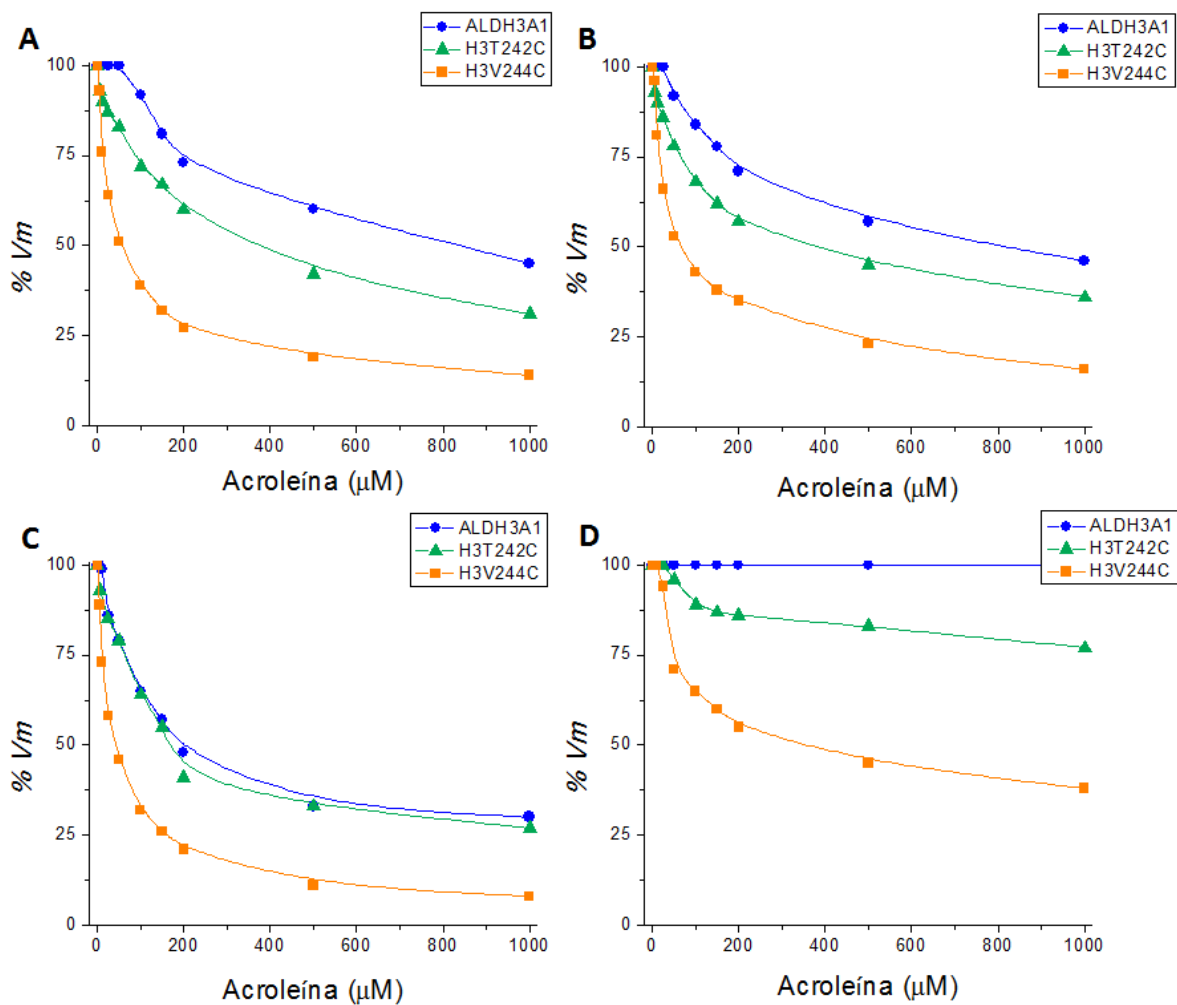


Figura 21. Perfil de inactivación de la enzima silvestre y las mutantes en presencia de acroleína. (A), perfil de inactivación de las enzimas; (B), perfil de inactivación de las enzimas incubadas a concentración saturante de benzaldehído (2 mM para ALDH3A1 y 10 mM para las enzimas mutantes); (C), perfil de inactivación de las enzimas incubadas con 1 mM de NADH; (D), perfil de inactivación de las enzimas incubadas con 1 mM de NADH y a concentración saturante de benzaldehído. Estos resultados son representativos de tres experimentos con preparaciones enzimáticas independientes.

Análisis y discusión de los resultados.

Actualmente existen informes en los que se sugiere que la susceptibilidad de las isoformas de ALDH a los aldehídos producidos durante la peroxidación lipídica, se debe principalmente a la formación de aductos con la Cys reactiva (Cys302), involucrada en la unión del aldehído y en la catálisis de la enzima (Kahnna et al., 2011). Lo anterior, se propuso por el mecanismo de formación de aductos con 4-HNE y acroleína, ya que como se explicó anteriormente, estos aldehídos lipídicos reaccionan fuertemente con cisteínas formando aductos de Michael (Doorn et al., 2002). De este modo, el aducto formado inutiliza a la cisteína reactiva, interfiriendo con la oxidación del aldehído e inactivando a la enzima. Al igual que en todas las isoformas de ALDH, el aminoácido encargado de la unión del aldehído y responsable de la catálisis en la ALDH3A1 es una Cys. Sin embargo, esta enzima no se inactiva por los aldehídos lipídicos, aún a concentraciones de 20 mM de acroleína, 1 mM de malondialdehído y 1 mM de 4-HNE (Yoval-Sánchez, et al., 2012). Por este hecho, la Cys reactiva no puede ser el blanco de inactivación de esta familia de enzimas. Como se mencionó en la sección de resultados, las mutantes H3V244C y H3T242C, son más sensibles que la ALDH3A1 al efecto tóxico de la acroleína, comenzando a inactivarse a concentraciones de 7 y 11 mM, respectivamente; mientras que la ALDH3A1 permanece activa aún a una concentración de 20 mM de este aldehído. Estos resultados sugieren que los residuos responsables de la formación de aductos, son las Cys adyacentes a la Cys reactiva en el sitio de unión del aldehído y que éstos son los responsables de la inactivación de las ALDHs por los aldehídos tóxicos. Sin embargo, la inactivación observada en las mutantes no es tan fuerte como la observada para ALDH2, pero esto puede ser debido a que se evaluó el efecto de cada cisteína por separado y quizá la mutante doble con el cambio de las dos cisteínas sería ahora tan sensible como la clase 2. Otra posibilidad es que estos residuos no sean los únicos responsables de la inactivación. El 4-HNE, además de reaccionar con residuos de cisteína, reacciona con residuos de histidina y lisina (Chávez et al., 2011). En el análisis del alineamiento de la secuencia de aminoácidos para ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1, se encontró que la ALDH2 posee un residuo de

lisina en el dominio de unión a la coenzima que participa en la unión y estabilización del NAD^+ , mientras que la ALDH3A1 posee una arginina en la misma posición; es importante resaltar que este último residuo no forma aductos con aldehídos. Este análisis sugiere, que el residuo de lisina presente en ALDH2, podría ser otro blanco importante en la formación de aductos, además de los residuos de cisteína (Yoval-Sánchez et al., 2012).

Para explicar el mecanismo de inactivación tenemos que cuando un aldehído insaturado reacciona con un residuo de cisteína adyacente a la Cys reactiva, se forma un aducto irreversible, de tal forma que no queda espacio suficiente en el sitio de unión al aldehído para dar paso a otra molécula de aldehído. Por lo tanto, por impedimento estérico no se puede continuar con el ciclo catalítico y la enzima se torna inactiva. Esta propuesta, es apoyada por los resultados del perfil de inactivación de H3T242C y H3V244C en presencia de acroleína, donde la inserción de cisteínas adyacentes a la cisteína catalítica volvió más sensibles a las mutantes generadas. La mutante H3V244C resultó ser más sensible a la inactivación por acroleína comparada con la H3T242C; éste resultado sugiere que la Cys en la posición 244 se encuentra más expuesta que la Cys en la posición 242 en el sitio de entrada del aldehído y por lo tanto, el residuo 244 se encuentra más accesible para formar el aducto con los aldehídos tóxicos (Figura 22).

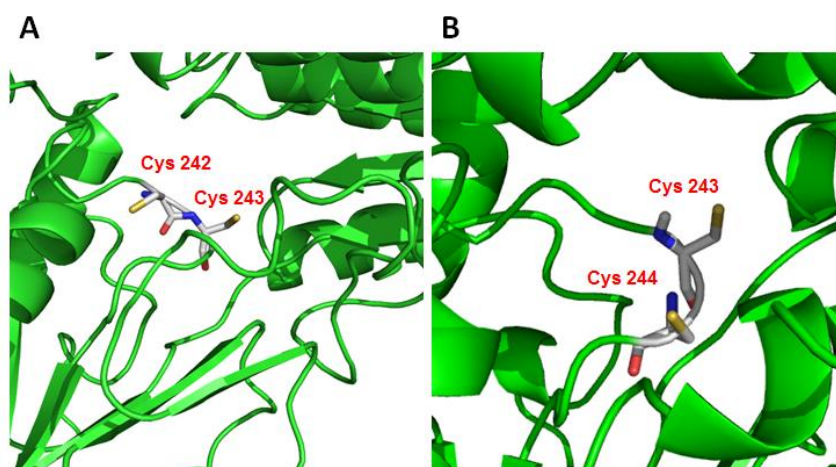


Figura 22. Modelo estructural del sitio de unión al aldehído en las mutantes, generado a partir del cristal de ALDH3A1. (A), H3T242C y (B), H3V244C.

La afinidad que presenta una enzima por un determinado sustrato, depende de los residuos presentes en el embudo catalítico, ya que estos se encuentran involucrados en la unión del sustrato o directamente en la catálisis enzimática (González-Segura et al., 2015). En el caso de las ALDHs, la diferencia en los aminoácidos que conforman el sitio activo de las distintas isoformas, propicia un ambiente catalítico hidrofóbico o hidrofílico (Figura 23). En particular, la ALDH2 (que utiliza preferentemente aldehídos de cadena corta) posee un ambiente hidrofílico (Figura 23A) en el sitio catalítico, debido a los aminoácidos presentes en ese sitio y a su arreglo estructural, mientras que la ALDH3A1 (que utiliza preferentemente aldehídos aromáticos y alifáticos de cadena larga) presenta un ambiente más hidrofóbico (Figura 23 B y D); esto repercute en la preferencia y afinidad que tienen las diferentes enzimas por los sustratos.

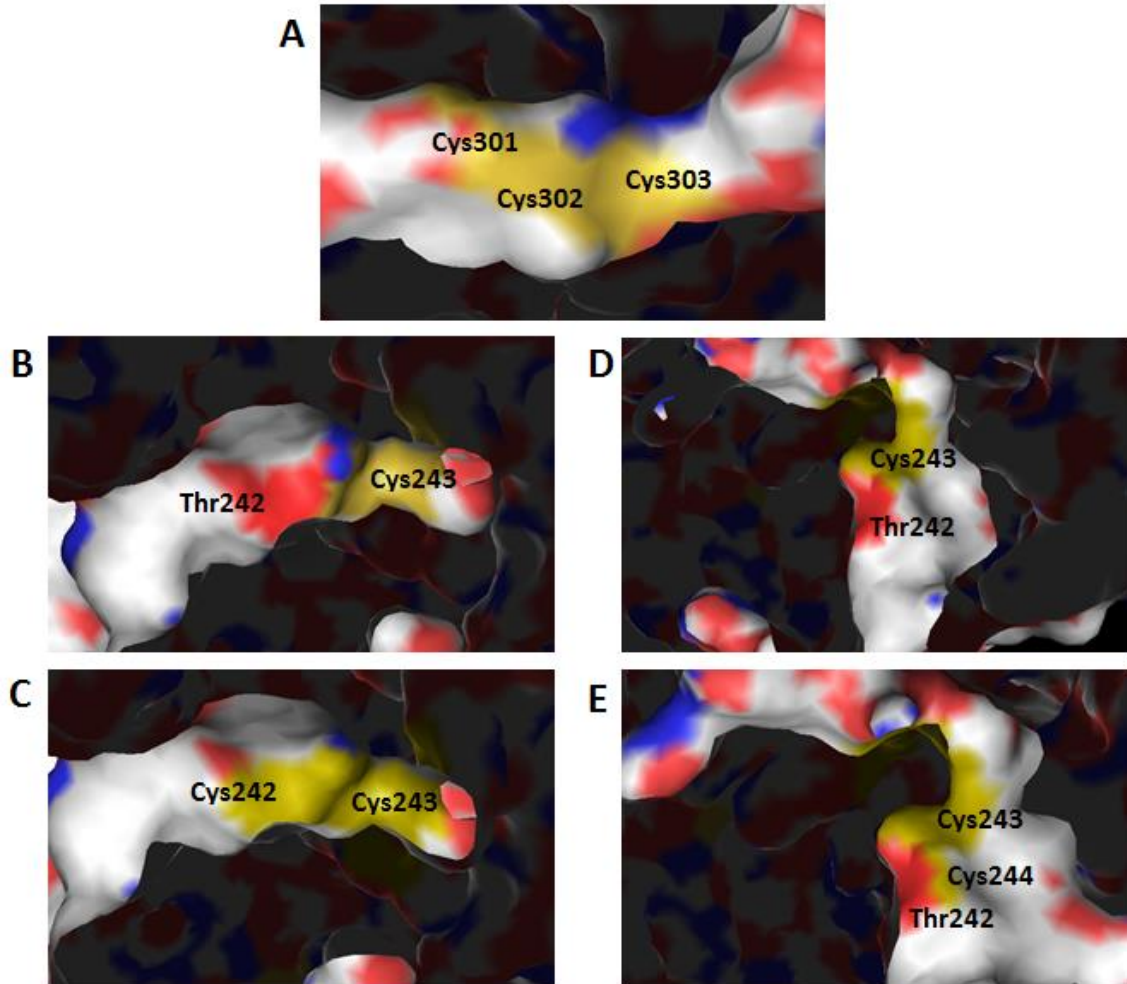


Figura 23. Comparación del sitio activo de las diferentes enzimas. En esta figura se muestran cortes transversales de los modelos de las diferentes enzimas para exponer el interior del sitio activo. (A), ALDH2; (B), ALDH3A1; (C), H3T242C; (D), otra perspectiva de ALDH3A1; (E), H3V244C. La cisteína catalítica en aLDH2 es la 302 y en ALDH3 en la posición equivalente es la cisteína 243.

En la figura 23E se ilustra el sitio activo de H3V244C y se observa que el residuo de Thr 242 junto con la Cys en la posición 244, le proporciona un ambiente más hidrofílico al sitio. Por otro lado la mutante H3T242C (Figura 23C), conserva un ambiente un poco menos hidrofóbico que ALDH3A1, pues la treonina, es un aminoácido más parecido a la cisteína en cuanto a su polaridad, mientras que la valina es un aminoácido no polar a diferencia de la cisteína.

Lo anterior se refleja en los parámetros cinéticos determinados, ya que ellos revelan que la mutante H3V244C toma con mayor afinidad a la acroleína ($K_m=0.57$ mM) que el benzaldehído ($K_m=0.78$ mM), mientras que la ALDH3A1 y H3T242C toman con mayor afinidad el benzaldehído ($K_m=0.2$ mM y 0.93 mM, respectivamente) que la acroleína ($K_m=1.47$ mM y 2.34 mM, respectivamente). Así mismo, la ALDH2 presenta una K_m de 1.2 μ M por acroleína y no cataliza la oxidación del benzaldehído. El cambio de preferencia por sustratos en la enzima mutada H3V244C, nos sugiere que cambió la hidrofobicidad del sitio activo, permitiendo que la enzima ahora sea más afín por aldehídos alifáticos.

El hecho de que la velocidad máxima con benzaldehído haya disminuido en ambas mutantes, podría estar relacionado con el paso limitante de la reacción, ya que de este paso depende la velocidad global. En ALDH3A1, el paso limitante de la reacción es la transferencia del hidruro, por lo tanto si este paso, se vuelve más limitante en las mutantes, esto nos indicaría que la transferencia del hidruro es ahora más lenta y disminuiría la velocidad con la que ocurre la reacción. Finalmente, la eficiencia catalítica con benzaldehído en ambas mutantes se afectó, disminuyendo 10 veces respecto a la enzima silvestre, lo anterior se debió al aumento en la K_m y a la disminución de 3 veces en la velocidad máxima. Por otro lado, la eficiencia catalítica por acroleína no se comprometió para ninguna mutante, ya que en el caso de H3T242C se incrementó la velocidad máxima pero disminuyó la afinidad y en el caso de H3V244C se incrementó la afinidad, pero disminuyó la velocidad máxima de la reacción, con respecto a ALDH3A1.

Conclusiones

El cambio de los aminoácidos adyacentes a la cisteína catalítica por cisteínas en las mutantes de ALDH3A1, generó enzimas mucho más susceptibles al efecto de la acroleína, comparadas con la enzima silvestre, con el siguiente orden de susceptibilidad: H3V244C>>H3T242C>ALDH3A1. Estos resultados aunado a los de la protección que ejercen el benzaldehído y el NADH de la inactivación por acroleína, sugieren fuertemente que estos residuos de cisteína en el sitio de unión del aldehído, son los principales responsables de la inactivación de las ALDHs por los aldehídos lipídicos. Siguiendo esté criterio se podrían diseñar enzimas que sean más resistentes al efecto inactivador de algunos aldehídos, principalmente insaturados y posteriormente buscar el cambio de los residuos más convenientes para no modificar los parámetros cinéticos y de esta manera optimizar la eficiencia catalítica con esos aldehídos.

El incremento en la afinidad por acroleína que presenta la mutante H3V244C, respecto a la enzima nativa, sugiere que estos residuos también están involucrados en la determinación de la especificidad por el sustrato.

Perspectivas

Como trabajo por realizar de este proyecto queda pendiente la generación de la mutante con el cambio de las dos cisteínas, para evaluar si en la doble mutante se potencia el efecto inhibitor de los aldehídos tóxicos. Así mismo, queda pendiente la determinación del paso limitante en H3T242C y H3V244C, para compararlo con la ALDH3A1 y entender porque la velocidad máxima disminuye en ambas mutantes. También se plantea evaluar la afinidad que presentan estas enzimas por otros aldehídos alifáticos saturados e insaturados para tener una idea más clara del papel de estos residuos en la determinación de la especificidad por los sustratos.

La ALDH2 es la enzima más susceptible a la inactivación por los aldehídos lipídicos, pero también es la isoforma que presenta una mayor eficiencia catalítica con estos compuestos tóxicos (Yoval-Sánchez et al., 2012). Por lo anterior, otra vertiente del proyecto sería generar una mutante de ALDH2 cambiando los residuos de cisteína 301 y 303, adyacentes a la Cys reactiva, por los residuos presentes en ALDH3A1. Se espera obtener una mutante de ALDH2 humana resistente a la inactivación por los productos de la peroxidación lipídica. De esta mutante se realizaría la caracterización cinética (K_m , V_{max} y V_{max}/K_m) y se determinaría la susceptibilidad por acroleína y 4-HNE para evaluar si el cambio de estos residuos se logró disminuir la susceptibilidad de la enzima por los aldehídos lipídicos.

Referencias bibliográficas.

Acrolein Health and Safety Guide No 67. Organización mundial de la salud. 1999.

Bennett, A. F., Buckley, P. D., and Blackwell, L. F. (1983). Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions. *Biochemistry* 22, 776-784.

Blackwell, L. F., Motion, R. L., MacGibbon, A. K., Hardman, M. J., and Buckley, P. D. (1987). Evidence that the slow conformation change controlling NADH release from the enzyme is rate-limiting during the oxidation of propionaldehyde by aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry Journal*. 242(3): 803-808.

Blake DR, Allen RE, Lunec J. (1987). Free radicals in biological systems, a review orientated to inflammatory processes. *British Medical Bulletin*. 43(2):371-385.

Boesch JS, Lee C, Lindahl RG. (1996). Constitutive expression of class 3 aldehyde dehydrogenase in cultured rat corneal epithelium. *The Journal of Biological Chemistry*. 271(9):5150-5157.

Chavez JD, Wu J, Bisson W, Maier CS. (2011). Site-specific proteomic analysis of lipoxidation adducts in cardiac mitochondria reveals chemical diversity of 2-alkenal adduction. *Journal of Proteomics*. 74(11):2417-29.

Chen CH, Budas GR, Churchill EN, Disatnik MH, Hurley TD, Mochly-Rosen D. (2008). Activation of aldehyde dehydrogenase-2 reduces ischemic damage to the heart. *Science*. 321(5895):1493-1495.

Chen Z, Stamler JS. (2006). Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 16(8):259-265.

Dickinson, F. M., and Hart, G. J. (1982). Effects of Mg^{2+} , Ca^{2+} and Mn^{2+} on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochemical. Journal*. 205, 443-448.

Doorn JA, Petersen DR. (2002). Covalent modification of amino acid nucleophiles by the lipid peroxidation products 4-hydroxy-2-nonenal and 4-oxo-2-nonenal. *Chemical Research in Toxicology*. 15(11):1445-1450.

Duester G. (2000). Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 267(14):4315-4324.

Eaton P, Li JM, Hearse DJ, Shattock MJ. (1999). Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in ischemic rat heart. *The American Journal of Physiology*. 276(3 Pt 2):H935-H943.

Eisenthal R, Danson MJ, Hough DW. (2007). Catalytic efficiency and k_{cat}/K_M : a useful comparator. *Trends in Biotechnology*. 25(6):247-249.

Esterbauer H, Wäg G, Puhl H. (1993). Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *British Medical Bulletin*. 49(3):566-576.

Esterbauer H. (1993). Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 57(5 Suppl):779S-785S.

Feldman RI and Weiner H. (1971). Horse liver aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 247(1):260-266.

Feldman, R. I., and Weiner, H. (1972). Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 247:267-272.

Galter D, Buervenich S, Carmine A, Anvret M, Olson L. (2003). ALDH1 mRNA: presence in human dopamine neurons and decreases in substantia nigra in Parkinson's disease and in the ventral tegmental area in schizophrenia. *Neurobiology of Disease*. 14(3):637-647.

Hempel J, Bühler R, Kaiser R, Holmquist B, de Zalenski C, von Wartburg JP, Vallee B, Jörnvall H. (1984). Human liver alcohol dehydrogenase. 1. The primary

structure of the beta 1 beta 1 isoenzyme. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 145(3):437-445.

Hempel J, Nicholas H, Lindahl R. (1993). Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Science: a publication of the Protein Society*. 2(11):1890-1900.

Hempel J, von Bahr-Lindström H, Jörnvall H. (1984). Aldehyde dehydrogenase from human liver. Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. *European Journal of Biochemistry/FEBS*. 141(1):21-35.

Ho KK, Allali-Hassani A, Hurley TD, Weiner H. (2005). Differential effects of Mg²⁺ ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry*. 44(22):8022-8029.

Ho, K. K., Allali-Hassani, A., Hurley, T. D., and Weiner, H. (2005). Differential effects of Mg²⁺ ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry* 44:8022-8029.

Horton RM, Cai Z, Ho SM, Pease LR. (1990). Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 8(5):528-535.

Hsu LC, Chang WC, Yoshida A. (1992). Cloning of a cDNA encoding human ALDH7, a new member of the aldehyde dehydrogenase family. *Gene*. 151(1-2):285-289.

Johnson CT, Bosron WF, Harden CA, Li TK. (1987). Purification of human liver aldehyde dehydrogenase by high-performance liquid chromatography and identification of isoenzymes by immunoblotting. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*. 11(1):60-65.

Kaneko T, Tahara S, Taguchi T, Kondo H. (2001). Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, and change of repair systems during in vitro cellular aging of cultured human skin fibroblasts. *Mutation Research*. 487:19-30.

Khanna M, Chen CH, Kimble-Hill A, Parajuli B, Perez-Miller S, Baskaran S, Kim J, Dria K, Vasiliou V, Mochly-Rosen D, Hurley TD. (2011). Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*. 286(50):43486-43494.

King G, Holmes R. (1998). Human ocular aldehyde dehydrogenase isozymes: distribution and properties as major soluble proteins in cornea and lens. *The Journal of Experimental Zoology*. 282(1-2):12-17.

Klyosov AA, Rashkovetsky LG, Tahir MK, Keung WM. (1996). Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism. *Biochemistry*. 35(14):4445-56.

Klyosov AA. (1996). Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry*. 35(14):4457-4467.

Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*. 48(5):425-435.

Lassen N, Bateman JB, Estey T, Kuszak JR, Nees DW, Piatigorsky J, Duester G, Day BJ, Huang J, Hines LM, Vasiliou V. (2007). Multiple and additive functions of ALDH3A1 and ALDH1A1: cataract phenotype and ocular oxidative damage in *Aldh3a1(-/-)/Aldh1a1(-/-)* knock-out mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(35):25668-25676.

Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. (2007). The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 19(2):100-112.

Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, Chung YJ, Hsiao CD, Chang WR, Kuo I, Perozich J, Lindahl R, Hempel J, Wang BC. (1997). The first structure of an aldehyde

dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural and Molecular Biology*. 4(4):317-326.

Łuczaj W, Skrzydlewska E. (2003). DNA damage caused by lipid peroxidation products. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 8(2):391-413.

Łuczaj W, Waszkiewicz E, Skrzydlewska E, Roszkowska-Jakimiec W. (2004). Green tea protection against age-dependent ethanol-induced oxidative stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*. 67(7):595-606.

MacGibbon AK, Buckley PD, Blackwell LF. (1977). Evidence for two-step binding of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide to aldehyde dehydrogenase. *The Biochemical Journal*. 1;165(3):455-62.

Maeda M, Hasumura Y, Takeuchi J. (1988). Localization of cytoplasmic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase isozymes in human liver. *Laboratory Investigation. Journal of Technical Methods and Pathology*. 59(1):75-81.

Mann CJ, Weiner H. (1999). Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. *Protein Science: a publication of the Protein Society*. 8(10):1922-1929.

Manual de agentes carcinogénicos de la IARC, 2006

Marchal S, Branlant G. (1999). Evidence for the chemical activation of essential cys-302 upon cofactor binding to nonphosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry*. 38(39):12950-12958.

Marchitti SA, Deitrich RA, Vasiliou V. (2007). Neurotoxicity and metabolism of the catecholamine-derived 3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde and 3,4-dihydroxyphenylglycolaldehyde: the role of aldehyde dehydrogenase. *Pharmacological reviews*. 59(2):125-150.

Moore SA, Baker HM, Blythe TJ, Kitson KE, Kitson TM, Baker EN. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure*. 6(12):1541-1551.

Ni L, Zhou J, Hurley TD, Weiner H. (1999). Human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase: three-dimensional structure and the restoration of solubility and activity of chimeric forms. *Protein Science: a publication of the Protein Society*. 8(12):2784-2790.

Northrop DB. (1999). Rethinking fundamentals of enzyme action. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 73:25-55.

Papazafiropoulou A, Skliros E, Sotiropoulos A, Papafragos C, Gikas A, Apostolou O, Kaliora H, Tountas C. (2011). Prevalence of target organ damage in hypertensive subjects attending primary care: C.V.P.C. study (epidemiological cardio-vascular study in primary care). *BMC Family Practice*. 1471(2296):12-75.

Pappa A, Brown D, Koutalos Y, DeGregori J, White C and Vasiliou V. (2005). Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*. 280:27998-28006.

Pappa A, Chen C, Koutalos Y, Townsend AJ, Vasiliou V. (2003). Aldh3a1 protects human corneal epithelial cells from ultraviolet- and 4-hydroxy-2-nonenal-induced oxidative damage. *Free Radical Biology & Medicine*. 34(9):1178-1189.

Pappa A, Estey T, Manzer R, Brown D, Vasiliou V. (2003). Human aldehyde dehydrogenase 3A1 (ALDH3A1): biochemical characterization and immunohistochemical localization in the cornea. *The Biochemical Journal*. 376(Pt 3):615-623.

Ratcliff MA, Dane AJ, Williams A, Ireland J, Luecke J, McCormick RL, Voorhees KJ. (2010). Diesel particle filter and fuel effects on heavy-duty diesel engine emissions. *Environmental Science & Technology*. 44(21):8343-8349.

Rodriguez-Zavala J, Weiner H. (2001). Role of the C-terminal tail on the quaternary structure of aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*. 132(1-3):151-160.

Rodríguez-Zavala JS, Allali-Hassani A, Weiner H. (2006). Characterization of *E. coli* tetrameric aldehyde dehydrogenases with atypical properties compared to other aldehyde dehydrogenases. *Protein Science*. 15(6):1387-1396.

Segel IH. (1993). *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*.

Steinmetz, C. G.; Peiguang, X.; Weiner, H. and Hurley, T. D. (1997). Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5:701–711.

Takahashi, K., and Weiner, H. (1980). Magnesium stimulation of catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Changes in molecular weight and catalytic sites, *The Journal of Biological Chemistry*. 255, 8206-8209.

Tappel A. L. (1953). The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by hematin compounds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 44(2): 378-395.

Vallari, R. C., and Pietruszko, R. (1984) Interaction of Mg²⁺ with human liver aldehyde dehydrogenase. I. Species difference in the mitochondrial isozyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 259, 4922-4926.

Vasiliou V, Pappa A, Petersen DR. (2000). Role of aldehyde dehydrogenases in endogenous and xenobiotic metabolism. *Chemico-Biological Interactions*. 129 (1-2):1-19.

Wang MF, Han CL, Yin SJ. (1995). Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*. 16;178(1-3):36-9.

Wang X, Weiner H. (1995). Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry*. 34(1):237-243.

Weiner, H., Hu, J. H., and Sanny, C. G. (1976) Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 251:3853-3855.

Weiner, H., Hu, J. H., and Sanny, C. G. (1976). Rate-limiting steps for the sterease and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *Journal Biological Chemistry*. 251(13): 3853-3855.

Westphal GA, Krahl J, Munack A, Rosenkranz N, Schröder O, Schaak J, Pabst C, Brüning T, Bünger J. (2013). Combustion of hydrotreated vegetable oil and jatropha methyl ester in a heavy duty engine. Emissions and Bacterial Mutagenicity. *Environmental Science & Technology*. 47(11):6038-6046.

Yan J, De Melo J, Cutz JC, Aziz T, Tang D. (2014). Aldehyde dehydrogenase 3A1 associates with prostate tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. 13;110(10).

Yoval-Sánchez B, Rodríguez-Zavala JS. (2012). Differences in susceptibility to inactivation of human aldehyde dehydrogenases by lipid peroxidation byproducts. *Chemical Research in Toxicology*. 25(3):722-729.

Zhou J, Weiner H. (2001). The N-terminal portion of mature aldehyde dehydrogenase affects protein folding and assembly. *Protein Science: a publication of the Protein Society*. 10(8):1490-1497.