



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

PAPEL DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA 301 Y 303 DEL SITIO ACTIVO DE LA  
ALDH2 HUMANA EN LA INACTIVACIÓN POR LOS ALDEHÍDOS LIPÍDICOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q.F.B. LUIS FRANCISCO CALLEJA CASTAÑEDA

TUTOR: DR. JOSÉ SALUD RODRÍGUEZ ZAVALA  
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. JUAN PABLO PARDO VÁZQUEZ      FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
DR. ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO      FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. José Salud Rodríguez Zavala en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Agradezco al comité tutor por todas las observaciones y comentarios realizados para el desarrollo de este proyecto, dicho comité se encontraba integrado por:

Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velazco Facultad de Medicina, UNAM

Dr. José S. Rodríguez Zavala Instituto Nacional de Cardiología

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca No. 379494 y por el financiamiento otorgado mediante los donativos No. 166463 y No. 78775 para la realización de este trabajo. También, se agradece al programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP), por el financiamiento otorgado para asistir al XXX congreso nacional de bioquímica en Guadalajara, México y al 29th simposio anual de la sociedad de proteínas en Barcelona, España.

Finalmente agradezco al jurado, por sus observaciones y comentarios.

Dra. Adela Rodríguez Romero Instituto de Química, UNAM

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres Facultad de Química, UNAM

Dr. Horacio Reyes Vivas Instituto Nacional de Pediatría

Dr. Ismael Bustos James Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Hugo Nájera Peña UAM Cuajimalpa

## Resumen

Los aldehídos son compuestos que poseen un grupo carbonilo, el cual proporciona a la molécula la propiedad de formar un dipolo y generar un centro electrofílico, que favorece su elevada inestabilidad y reactividad. Los aldehídos producidos durante la peroxidación lipídica (aldehídos insaturados), representan el grupo de aldehídos más reactivos, ya que contienen dos centros electrofílicos generados por la resonancia de los electrones en la molécula. Por otro lado, se ha observado que estos aldehídos se encuentran involucrados en la etiología y patogénesis de varias enfermedades en las que se genera un aumento en el estrés oxidativo. Se ha sugerido que esto se debe a la formación de aductos con algunos aminoácidos de las proteínas y con las purinas en el ácido desoxirribonucleico.

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son un grupo de enzimas que se encargan de la desintoxicación de los productos de la peroxidación lipídica. Entre las enzimas más estudiadas se encuentran la ALDH1A1, la ALDH2 y la ALDH3A1. A pesar de que estas enzimas se encargan de eliminar a los aldehídos lipídicos, se ha reportado que también se inactivan por estos aldehídos tóxicos, siendo la ALDH2 la enzima más sensible a la inactivación por acroleína y 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), comparada con la ALDH1A1 y la ALDH3A1, las cuales resisten concentraciones 10-100 veces más altas de estos aldehídos tóxicos, comparadas con la ALDH2. Datos de nuestro laboratorio sugieren que la presencia de residuos de cisteína adyacentes a la Cys reactiva (C302) en el sitio de unión del aldehído, son responsables de la inactivación de las ALDHs por los productos de la peroxidación lipídica. Por lo anterior, se propuso que al cambiar los residuos de cisteína adyacentes a la C302 en la ALDH2, la enzima sería resistente al efecto inactivador de estos aldehídos tóxicos.

En este trabajo se generaron dos enzimas mutadas de la ALDH2 humana, cambiando los residuos de cisteína adyacentes a la cisteína reactiva. En la primera se cambió el residuo C303V y en la segunda se cambiaron los residuos C301T y C303V, respectivamente. Los resultados mostraron que ambas proteínas fueron resistentes al efecto inactivador de la acroleína, 2-hexenal, 4-HNE y 2-nonenal, en comparación con la enzima silvestre. También, se observó que la eficiencia catalítica por los aldehídos lipídicos no cambió significativamente respecto a los valores obtenidos para la ALDH2. Sin embargo, en la mutante doble, el cambio de residuos promovió la modificación del paso limitante de la reacción. Finalmente, se evaluó el efecto que tiene la expresión de la mutante doble en células de *Escherichia coli* expuestas a peróxido de hidrógeno y se observó que las células que expresan la enzima mutante son más resistentes, que aquellas que expresan la enzima silvestre, indicando que la expresión de la mutante ALDH2C3031T-C303V, protege a la célula de los aldehídos tóxicos generados a partir de la peroxidación lipídica, promovida por la exposición a agentes oxidantes.

## Índice

|  |    |
|--|----|
| Introducción   | 1  |
| Capítulo 1. Generalidades de los aldehídos                     | 1  |
| Estructura y distribución de los aldehídos                     | 1  |
| Formación de bases de Schiff                                   | 3  |
| Adición de Michael   | 3  |
| Peroxidación lipídica  | 4  |
| Etiología y patogénesis de los aldehídos lipídicos             | 6  |
| Capítulo 2. Aspectos generales de las aldehído deshidrogenasas | 7  |
| Estructura y función de las aldehído deshidrogenasas           | 7  |
| ALDH2  | 11 |
| Mecanismo cinético de reacción de las aldehído deshidrogenasas | 11 |
| Etapas limitantes en ALDHs                                     | 13 |
| Capítulo 3. Antecedentes                                       | 14 |
| Susceptibilidad de las ALDHs por los aldehídos lipídicos       | 14 |
| Hipótesis  | 19 |
| Objetivo general   | 19 |
| Objetivos particulares   | 19 |
| Materiales y métodos   | 20 |
| Diseño de oligonucleótidos                                     | 20 |
| Obtención de las mutantes H2C303V y H2C301T-C303V              | 20 |

|  |    |
|--|----|
| Electroforesis en gel de agarosa (DNA)                                       | 21 |
| Extracción de DNA a partir de geles de agarosa                               | 21 |
| Ligación al vector de sobreexpresión pET-45b                                 | 22 |
| Transformación en células DH5- $\alpha$                                      | 22 |
| Extracción de DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos                | 23 |
| Análisis de restricción  | 24 |
| Análisis de Secuenciación  | 24 |
| Obtención de células competentes   | 25 |
| Transformación en células competentes de <i>E. coli</i> de la cepa BL21      | 25 |
| Expresión y purificación de la proteína recombinante                         | 26 |
| Cuantificación de la proteína  | 26 |
| Electroforesis de la proteína en geles de poliacrilamida en presencia de SDS | 27 |
| Determinación de pureza de la proteína                                       | 28 |
| Análisis cinético  | 28 |
| Caracterización cinética   | 28 |
| Análisis de la estabilidad de las diferentes enzimas                         | 29 |
| Desnaturalización por temperatura  | 29 |
| Desnaturalización por urea   | 29 |
| Evaluación de susceptibilidad a acroleína                                    | 29 |
| Determinación del paso limitante   | 30 |
| Ensayo de protección de células de <i>E. coli</i> BL21 del estrés oxidante   | 30 |

|   |    |
|---|----|
| Resultados y discusión  | 32 |
| Biología Molecular  | 32 |
| Obtención de los genes de las enzimas mutadas                           | 32 |
| Ligación del gen al vector de clonación                                 | 33 |
| Análisis de la secuencia de aminoácidos                                 | 34 |
| Sobreexpresión y purificación de las enzimas recombinantes              | 35 |
| Cinética enzimática   | 37 |
| Estabilidad de la proteína  | 37 |
| Susceptibilidad por los aldehídos lipídicos                             | 38 |
| Caracterización cinética  | 43 |
| Paso limitante de la reacción   | 45 |
| Determinación de la reactividad de la C302 con la actividad de esterasa | 48 |
| Activadores de las ALDHs  | 49 |
| Ensayo de protección celular del estrés oxidativo                       | 51 |
| Discusión general   | 53 |
| Conclusión  | 59 |
| Perspectivas  | 60 |
| Anexo I. Biología molecular   | 61 |
| Referencias bibliográficas  | 64 |

## Abreviaturas

|                  |  |
|------------------|--|
| ALDH             | Aldehído deshidrogenasa                            |
| ALDH1A1          | Aldehído deshidrogenasa clase 1A1                  |
| ALDH2            | Aldehído deshidrogenasa clase 2                    |
| ALDH3A1          | Aldehído deshidrogenasa clase 3A1                  |
| NAD <sup>+</sup> | 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                          |
| DNA              | Ácido desoxirribonucleico                          |
| ROS              | Especies reactivas de oxígeno                      |
| LPO              | Peroxidación lipídica                              |
| ALDA-1           | N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida |
| PDB              | Banco de datos de proteínas                        |
| PCR              | Reacción en cadena de la polimerasa                |
| SDS              | Dodecilsulfato de sodio                            |
| BSA              | Albumina de suero bovino                           |
| BCA              | Ácido biciconínico                                 |

## Introducción

### Capítulo 1. Generalidades de los aldehídos

#### Estructura y distribución de los aldehídos

Los aldehídos son compuestos orgánicos que contienen un grupo carbonilo al final de una cadena de carbonos, este grupo carbonilo proporciona a la molécula la propiedad de formar un dipolo y generar un centro electrofílico, el cual favorece su elevada inestabilidad y reactividad. Dentro de este grupo de compuestos carbonílicos se encuentran: 1) aldehídos saturados, como acetaldehído, propionaldehído, hexanaldehído y nonilaldehído; 2) alquenes insaturados, como la acroleína, 4-hidroxi-2-nonenaldehído (4-HNE), 4-hidroxi-2-hexenaldehído, 2-hexenaldehído y 2-nonenaldehído; 3) aldehídos aromáticos, como benzaldehído y 3,4-dihidroxifenilacetaldéhid (DOPAL), y 4) aldehídos dicarbonilos como el glioxaldehído y el malondialdehído (MDA) (McMurry, 2005) (Figura 1).

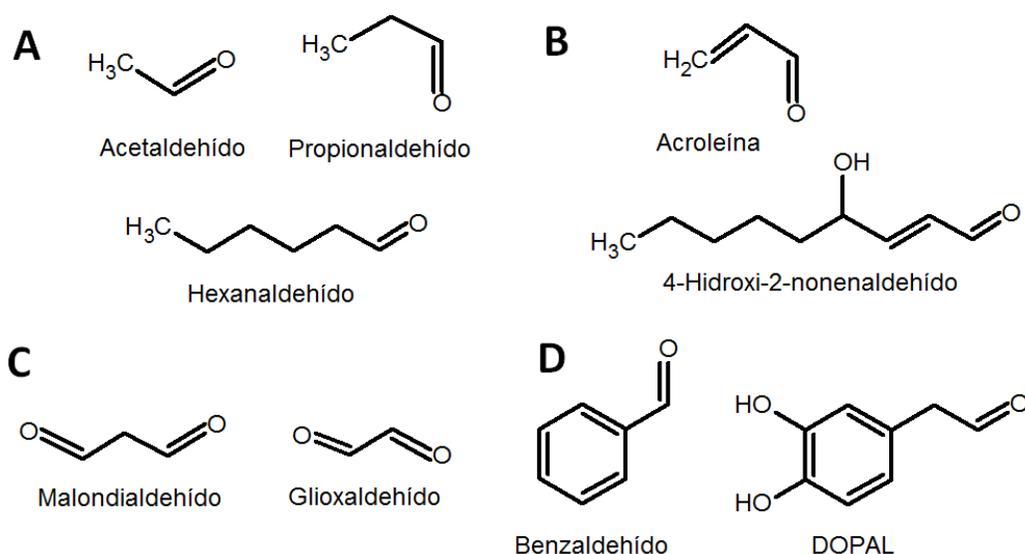


Figura 1. Estructura de los aldehídos. (A), aldehídos saturados; (B), aldehídos insaturados; (C), aldehídos dicarbonílicos; (D), aldehídos aromáticos.

Los aldehídos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y son generados durante numerosos procesos biológicos e industriales. En fábricas y vehículos son un producto secundario que proviene principalmente de la

combustión incompleta de hidrocarburos, pero también se encuentran en el humo de cigarrillos, de la madera y aceites quemados (OMS, 1999). Por otro lado, una gran variedad de aldehídos alifáticos y aromáticos como el benzaldehído, acetaldehído y citraldehído, existen de manera natural en diversos alimentos, particularmente en las frutas y en semillas oleaginosas, a las cuales proporcionan diferentes aromas y sabores (Friedman *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2014).

Fisiológicamente, los aldehídos son generados a partir de una amplia variedad de precursores endógenos y exógenos, y algunos son importantes reguladores cotranscripcionales y pueden participar como mensajeros en cascadas de señalización durante varios procesos biológicos, tal es el caso del retinaldehído que mediante su oxidación forma ácido retinoico, el cual juega un papel importante durante la embriogénesis en el crecimiento y desarrollo del feto (Duester, 2000). Otros aldehídos que participan en procesos de regulación celular, son los producidos durante la peroxidación lipídica (alquenes insaturados), cuyo efecto está determinado por la concentración; por ejemplo, el 4-HNE y la acroleína, a bajas concentraciones inducen la apoptosis mediada por la activación de caspasas y la muerte mitocondrial (Burcham *et al.*, 2001; Tanel *et al.*, 2007), mientras que a concentraciones más elevadas, estos compuestos generan muerte celular por necrosis. Se ha descrito que la acroleína es un compuesto que 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 (IARC, 2006; Cheng *et al.*, 2001). Los alquenes insaturados representan el grupo de aldehídos más reactivos, ya que contienen dos centros electrofílicos generados por la resonancia de los electrones en la molécula. Se ha sugerido que estos aldehídos reaccionan de manera primaria con el grupo sulfhidrilo de la cisteína, el grupo  $\alpha$ -amino de la lisina y el grupo imidazol de la histidina en las proteínas, a través de la formación de una base de Schiff o una de una reacción de adición de Michael (Chavez *et al.*, 2011; Carbone *et al.*, 2005).

## Formación de Bases de Schiff

El mecanismo de formación de una base de Schiff, comienza con la adición nucleofílica de una amina primaria (Lisina e Histidina) al grupo carbonilo del aldehído. El ataque de la amina, seguido de la protonación del átomo de oxígeno y la desprotonación del átomo de nitrógeno, da lugar a un intermediario estable denominado carbinolamina, el cual mediante una reacción de deshidratación se transforma en una base de Schiff (Figura 2A) (McMurry, 2005).

## Adición de Michael

La reacción de Michael, consiste en una adición nucleofílica a un compuesto carbonílico  $\alpha,\beta$  insaturado (acroleína, 4-HNE, 2-hexenal, 2-nonenal). Durante la reacción, primero ocurre el ataque del nucleófilo al carbono  $\beta$  del compuesto insaturado y, posteriormente, se genera un equilibrio ácido-base del compuesto formado (Figura 2B, 2C) (McMurry, 2005).

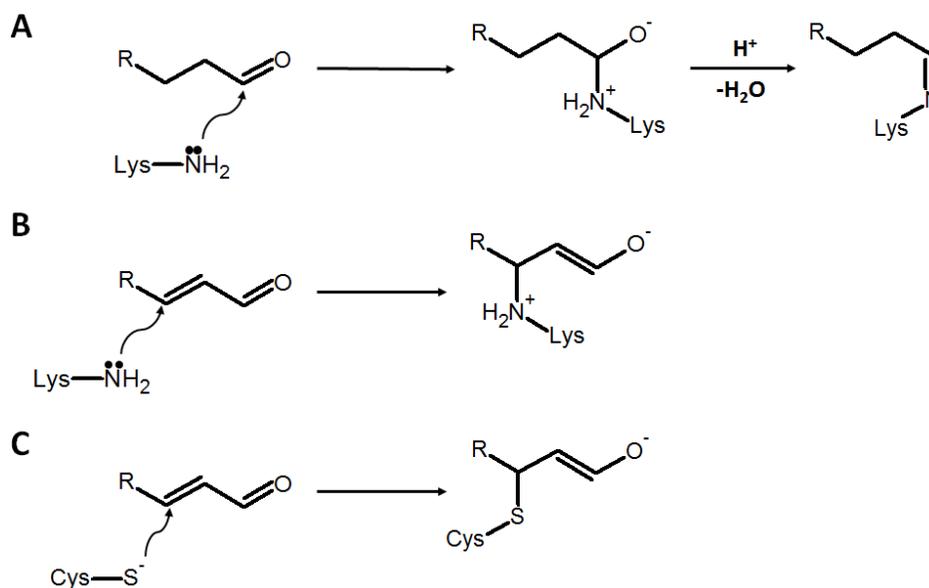


Figura 2. Mecanismo de formación de aductos con aldehídos. (A), Formación de una base de Schiff; (B), Adición de Michael con un residuo de lisina; (C), Adición de Michael con un residuo de cisteína.

## Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica (LPO) se define 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 dado por tres fases, la iniciación, propagación y la fase de terminación (Figura 3). Durante la **fase de iniciación**, las especies de oxígeno reactivas (ROS) como el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\bullet$ ) o el radical hidropéroxilo ( $^\bullet\text{HO}_2$ ) 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  $\text{H}_2\text{O}_2$  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.

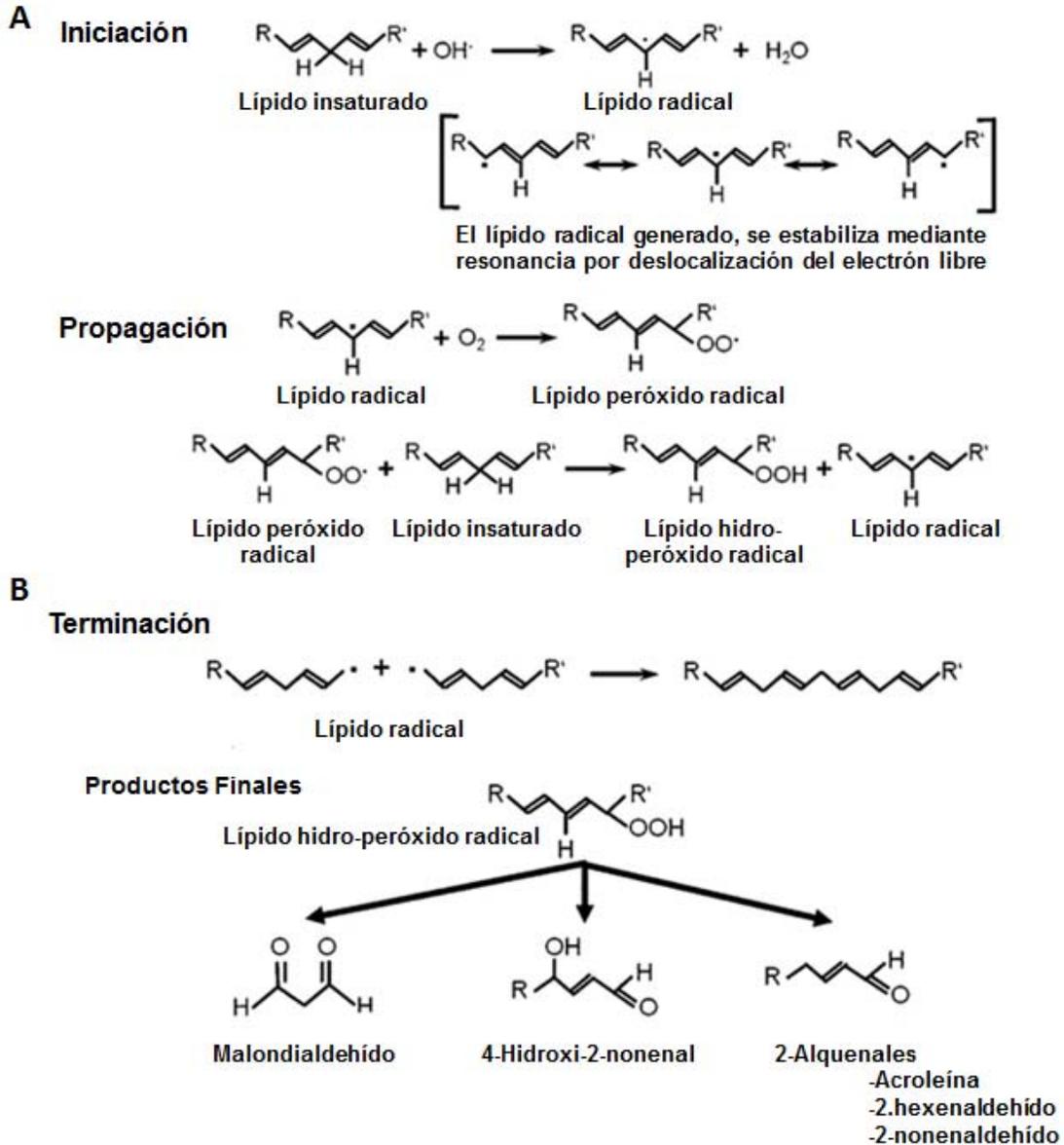


Figura 3. Peroxidación lipídica. (a) Fase de iniciación y propagación por radicales. En la fase inicial, el radical lipídico se estabiliza en diferentes estructuras de resonancia por deslocalización de los electrones libres. En la fase de propagación, los radicales lipídicos reaccionan con oxígeno molecular 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 hidroperoxilo de lípidos, se forman una variedad de productos de degradación como malondialdehído, 4-hidroxi-2-alquenes y 2-alquenes.

## **Etiología y patogénesis de los aldehídos lipídicos**

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 desoxiadenosina y desoxiguanosina del DNA formando aductos (Kaneko *et al.*, 2001). A diferencia de los radicales libres, los aldehídos tienen una vida media relativamente larga y debido a ello no solo reaccionan en el sitio donde se generan, también pueden difundir a sitios lejanos de donde originalmente fueron generados (Esterbauer *et al.*, 1991).

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 insaturación  $\alpha/\beta$  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).

## Capítulo 2. Aspectos generales de las aldehído deshidrogenasas

### Estructura y función de las aldehído deshidrogenasas

Las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) son una superfamilia de enzimas que se encargan de la oxidación de los aldehídos a sus correspondientes ácidos carboxílicos, mediante la reducción de  $\text{NAD(P)}^+$  a  $\text{NAD(P)H}$ . En el humano se han reportado 20 genes que codifican para diferentes isoformas de ALDHs, las cuales presentan un estado de oligomerización de dímero o de tetramero. ALDH1A1 y ALDH2 son tetrameros que comparten más de 70% de identidad en la secuencia de aminoácidos, mientras que ALDH3A1 es una enzima dimérica que comparte aproximadamente un 30% de identidad con las isoformas tetraméricas (Liu *et al.*, 1997; Steinmetz *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 1999). Si se superpone la estructura dimérica en la tetramérica, se puede observar que el tetramero es un dímero de dímeros (Figura 4).

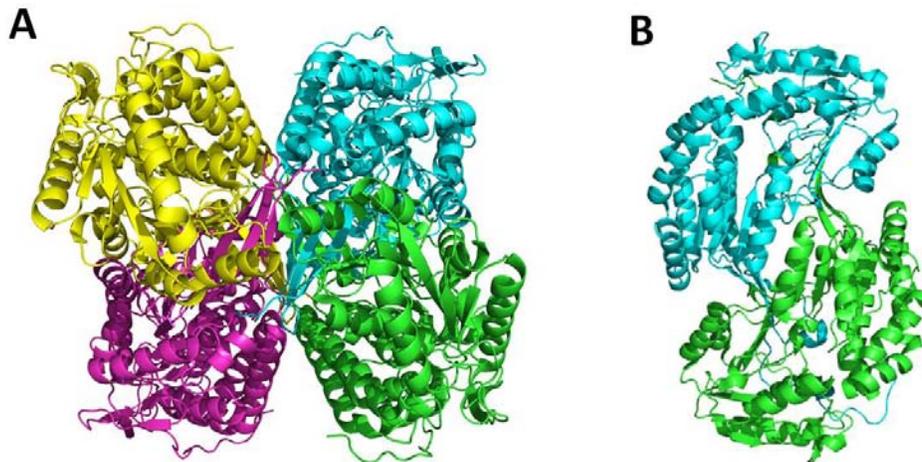


Figura 4. Diagrama de listón de la estructura cuaternaria presente en las diferentes isoformas de las ALDHs. (A), Tetramero de la ALDH2 (código PDB; 3N80); (B), Dímero de la ALDH3A1 (código PDB; 3SZA).

ALDH1A1 y ALDH2 tienen alrededor de 500 aminoácidos por monómero y con una masa aproximada de 54 kDa; por el contrario, cada monómero de ALDH3A1 presenta 453 aminoácidos en su secuencia y una masa aproximada de 50 kDa. Es importante mencionar que ALDH1A1 y ALDH2 presentan una

extensión de 56 aminoácidos en el extremo amino, respecto a ALDH3A1, la cual posee una extensión de 17 aminoácidos en el extremo carboxilo, a diferencia de las primeras dos enzimas. A pesar de las diferencias en la secuencia primaria de estas enzimas, los monómeros de todas las isoenzimas de ALDH poseen en esencia la misma estructura tridimensional (Figura 5A) (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha demostrado que el extremo amino de las ALDHs tetraméricas es importante para la estabilidad y plegamiento de la proteína (Ni *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2001). Mientras que, el extremo carboxilo de la proteína se extiende a través de la intercara dímero-dímero y es capaz de formar un ancla entre miembros de cada par de dímeros, por lo que parece ser importante para el acoplamiento de la proteína en tetrameros (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2002). Cada una de las isoenzimas posee tres dominios; el dominio catalítico, el dominio de unión de la coenzima y el dominio de oligomerización (Figura 5B) (Moore *et al.*, 1998). El dominio de oligomerización comprende tres hebras  $\beta$  antiparalelas, las cuales están involucradas en la interacción entre subunidades tanto en el dímero como en el tetramero.

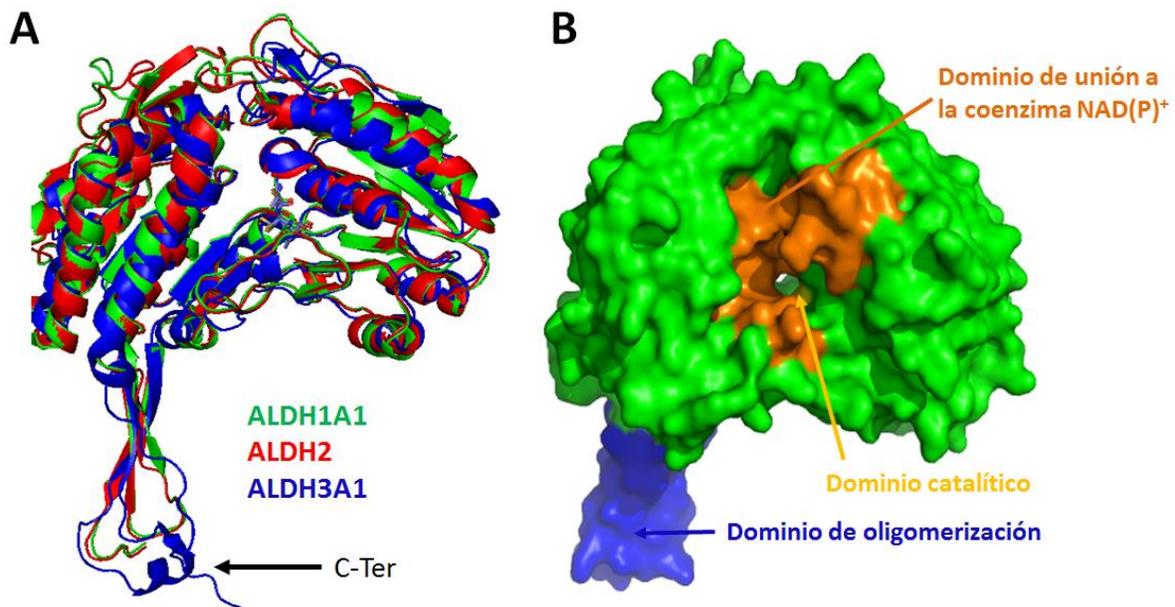


Figura 5. Estructura terciaria de las ALDHs. (A), alineamiento de los monómeros de ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1 (códigos PDB; 4WB9, 3N80 y 3SZA, respectivamente); (B), representación de los dominios estructurales por monómero.

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). El diámetro del embudo de entrada al sitio de unión del aldehído varía para cada isoforma, de tal modo que el diámetro para ALDH1A1 y ALDH2 es menor respecto al de ALDH3A1; de esta forma, se reduce el impedimento estérico y esto permite que aldehídos aromáticos o de cadena muy larga puedan entrar al sitio activo de esta isoforma; aunado a esto la cantidad de aminoácidos hidrofílicos expuestos en el sitio de unión del aldehído es menor en ALDH3A1 (Belmont-Díaz *et al.*, 2015). Es quizá por estas diferencias estructurales que la preferencia por las diferentes clases de aldehídos varía para cada isoforma.

Las aldehído deshidrogenasas son enzimas tejido específicas (Tabla 1) (Vasilis *et al.*, 2000). 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).

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 en respuesta a 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 ROS, cuando se rebasa la capacidad antioxidante (Vasilis *et al.*, 2000).

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

| Gen      | 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 $\gamma$ -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 $\gamma$ -semialdehído |

Modificado de Vasilis *et al.*, (2000)

## **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), el cual es un mensajero intracelular que regula la actividad celular (Chen *et al.*, 2006). También, se ha descrito que la protección de esta enzima, mediante la administración del compuesto activador de la ALDH2 N-(1,3-benzodioxol-5-ilmetil)-2,6-diclorobenzamida (ALDA-1) antes de un evento isquémico, reduce el tamaño del infarto en un 60% (Chen *et al.*, 2008). Lo anterior se asocia con la disminución de los niveles de 4-HNE, pues es uno de los principales compuestos que se acumulan durante la isquemia. Por lo anterior, se ha propuesto que la eliminación de 4-HNE por la ALDH2, puede ser uno de los mecanismos por los cuales esta enzima protege al corazón del daño generado (Eaton *et al.*, 1999). En la enfermedad de Alzheimer también se ha observado una importante participación de esta enzima debido al incremento en la concentración de 4-HNE en múltiples regiones del cerebro.

### **Mecanismo cinético de reacción de las aldehído deshidrogenasas**

El mecanismo de reacción de este grupo de enzimas es BiBi secuencial ordenado (Figura 6), lo cual indica que los sustratos entran y salen en un orden estricto. En un primer paso, la coenzima oxidada ( $\text{NAD}^+$ ) 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 (C243 en la ALDH3A1; C302 en la ALDH1A1 y en 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  $\text{NAD}^+$  el cual se reduce a  $\text{NADH}$ , en este paso se forma un intermediario tioéster. Después de la transferencia del hidruro, cambia la rotación de los enlaces del grupo pirofosfato del  $\text{NADH}$  cambiando la posición del anillo de nicotinamida (MacGibbon *et al.*, 1977), lo cual favorece la conformación de salida de la coenzima reducida. Finalmente, un ion hidroxilo que es 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 ( $\text{NADH}$ ), que es el segundo producto.

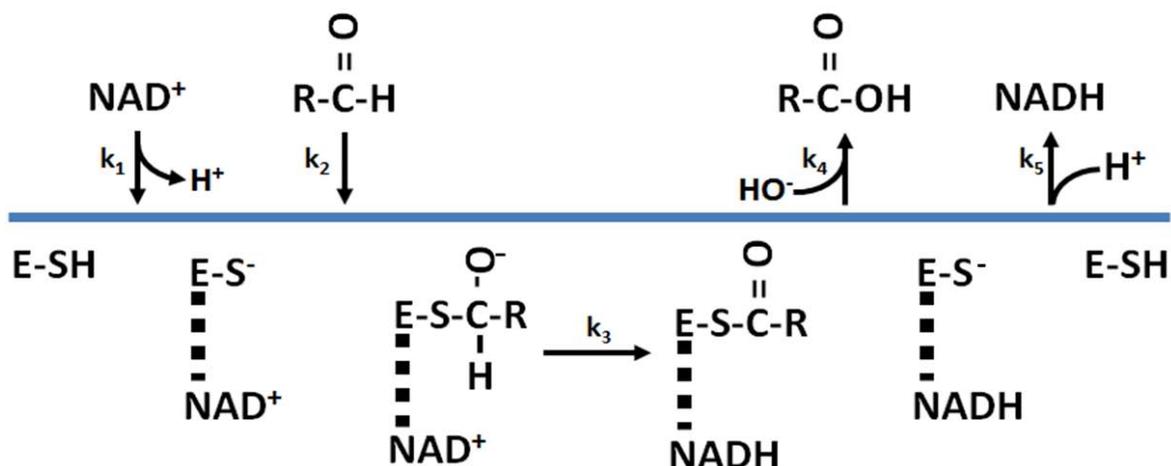


Figura 6. Mecanismo general de reacción para la oxidación de aldehídos por las ALDHs  $k_1$ , unión de la coenzima oxidada;  $k_2$ , unión del aldehído;  $k_3$ , transferencia del hidruro;  $k_4$ , liberación del acilo;  $k_5$ , liberación de la coenzima reducida.  $k$ , representa la constante de velocidad para cada uno de los pasos involucrados en la catálisis (Modificado de Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006).

## Etapas limitantes en ALDHs

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 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).

Cuando el paso limitante se encuentra después de la transferencia del hidruro, es posible medir el fenómeno denominado “explosión” (del inglés burst), el cual es el resultado del NADH generado en el primer ciclo catalítico durante el estado pre-estacionario. La explosión se puede medir como un cambio de fluorescencia debido al NADH producido antes de entrar al estado estacionario (Yoval-Sánchez *et al.*, 2013).

Por otra parte, se ha reportado que algunos cationes divalentes, como el  $\text{Ca}^{2+}$ , el  $\text{Mg}^{2+}$  y el  $\text{Mn}^{2+}$ , 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  $\text{Mg}^{2+}$  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 éste 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 éste 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).

### Capítulo 3. Antecedentes

#### Susceptibilidad de las ALDHs a los aldehídos lipídicos

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 comienza a inactivarse a partir de 5  $\mu\text{M}$  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 7).

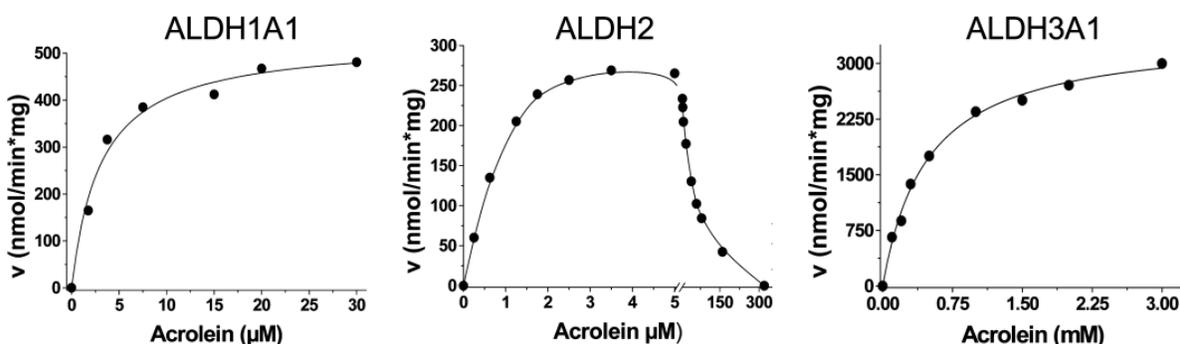


Figura 7. Curvas de saturación de ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1 con acroleína a pH 7.4 (Yoval-Sánchez *et al.*, 2012).

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 (Doorn *et al.*, 2002). En la figura 8 se puede observar que las ALDHs presentan un residuo de cisteína en la posición 302 (Cys302) (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 cisteína 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 8).

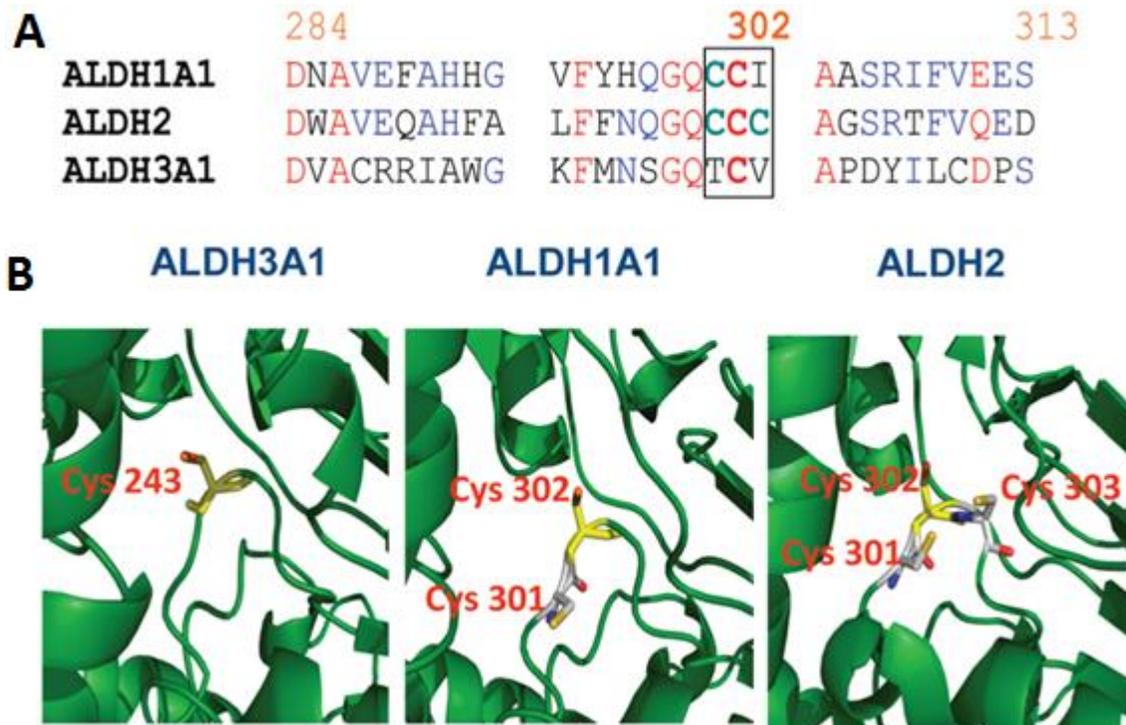


Figura 8. Secuencia de aminoácidos y estructura del sitio de unión del aldehído en las ALDHs humanas más estudiadas. (A) En el rectángulo se presentan los residuos de cisteína adyacentes a la Cys reactiva en la posición 302 (243 en ALDH3A1). La ALDH3A1 posee sólo la Cys reactiva. (B) Orientación de los residuos de Cys en el sitio de unión aldehído (Yoval-Sánchez *et al.*, 2012).

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 sulfhídrico 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 de la reacción determinado para la mayoría de las isoformas de las ALDHs), la ALDH2 comienza a inactivarse a una concentración menor a 2  $\mu\text{M}$  de acroleína, mientras que la ALDH1A1 se inactiva a concentraciones por arriba de 30  $\mu\text{M}$ . A este pH, la ALDH3A1 no se inactiva, incluso a concentraciones de 20 mM (Figura 9).

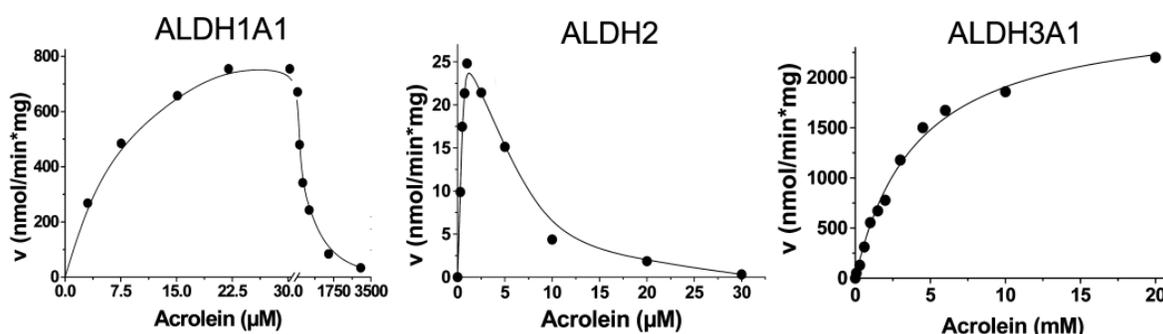


Figura 9. Curvas de saturación de ALDH1A1, ALDH2 y ALDH3A1 con acroleína a pH 9.5 (Yoval-Sánchez *et al.*, 2012).

Teniendo en consideración la respuesta 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 cisteína, proponemos que los residuos de cisteína adyacentes a la Cys catalítica en el sitio de unión del aldehído, son los blancos para 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 cisteína adyacentes a la cisteína reactiva (Cys243) en el sitio de unión del aldehído. En la primera se cambió el residuo de T242 por C y en la segunda se cambió el residuo de V244 por C, los resultados mostraron que ambas mutantes fueron más sensibles al efecto inactivador de la acroleína en comparación con la enzima silvestre (Calleja-Castañeda, 2015). Como se mencionó anteriormente, la ALDH3A1 resiste hasta 20 mM de acroleína, mientras que la mutante H3T242C comienza a inactivarse a una concentración de acroleína de 11 mM a pH 7.4; a pH 9.5, la inactivación comienza a partir de 7 mM (Figuras 10B y 10E). Por otra parte,

ALDH3V244C es la mutante 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% de su actividad en presencia de 6 mM de este aldehído, a pH 7.4 (Figura 10C). Además, a pH de 9.5 no se detectó actividad de esta enzima en presencia de acroleína, lo cual indica que esta mutante en particular se inactiva a concentraciones menores a 1  $\mu$ M de este aldehído lipídico.

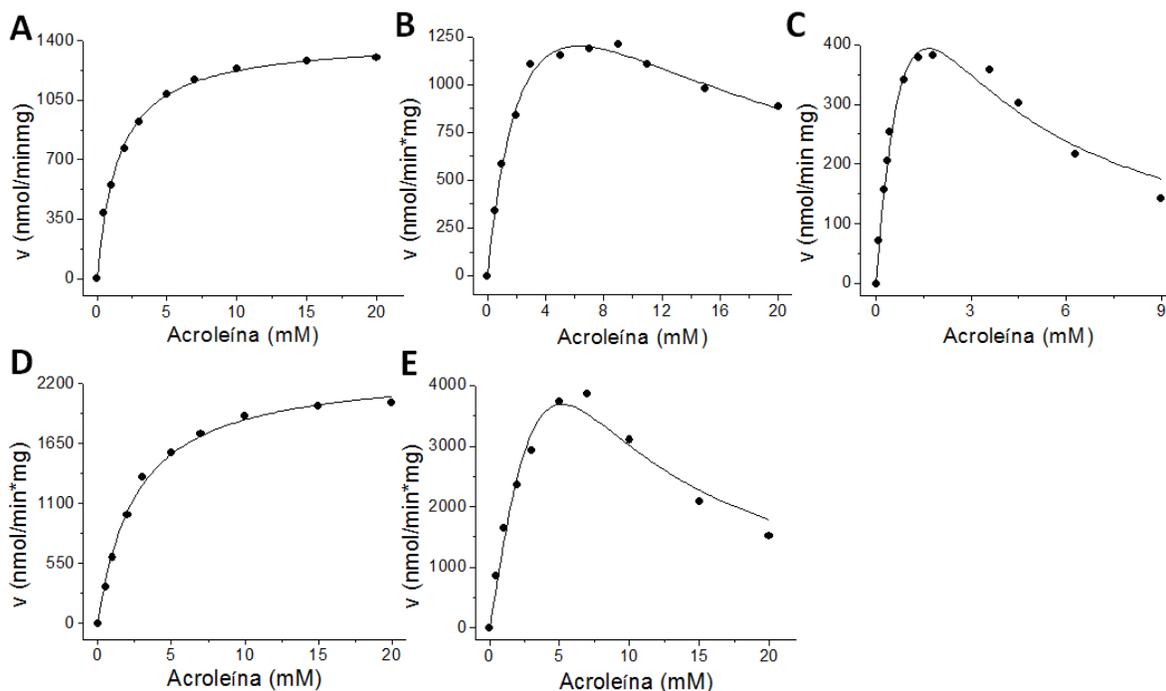


Figura 10. Curvas de saturación de las enzimas con acroleína. (A), (B) y (C), corresponden a ALDH3A1, H3T242C, y H3V244C, respectivamente, a pH 7.4; (D) y (E), corresponden a ALDH3A1 y H3T242C, respectivamente, a pH 9.5 (Calleja-Castañeda, 2015).

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 blancos de la inactivación por aldehídos producto de la lipoperoxidación. Este efecto, se hace más evidente a pH de 9.5, donde el grupo sulfhidriilo de la cisteína se encuentra ionizado y, por lo tanto, es más susceptible a reaccionar con los aldehídos. Siguiendo este razonamiento, se generaron dos mutantes de la

ALDH2 humana, sustituyendo los residuos de cisteína en las posiciones 301 y 303 adyacentes a la cisteína reactiva (C302) en el sitio de unión del aldehído, mimetizando con ello lo que ocurre en la ALDH3A1; esto con el fin de generar una mutante de la ALDH2 resistente a los aldehídos lipídicos, pues esta es la enzima que presenta una mejor eficiencia catalítica por estos compuestos tóxicos.

## **Hipótesis**

Al cambiar los residuos de cisteína 301 y 303 del sitio de unión al aldehído en la ALDH2 humana, por los aminoácidos presentes en las posiciones equivalentes en la ALDH3A1, se obtendrá una enzima resistente a la inactivación por los productos de la peroxidación lipídica.

## **Objetivo general**

Evaluar el efecto del cambio de los residuos de cisteína adyacentes a la cisteína reactiva en ALDH2, sobre las propiedades de la enzima.

## **Objetivos particulares**

1. Generar una doble mutante de ALDH2 (ALDH2-C301T-C303V), cambiando los residuos de cisteína 301 y 303 por treonina y valina, respectivamente.
2. Generar una mutante sencilla de ALDH2 (ALDH2-C303V), cambiando el residuo de cisteína 303 por valina para evaluar el efecto de la mutación individual.
3. Determinar los parámetros cinéticos por los diferentes grupos de aldehídos (saturados e insaturados).
4. Evaluar la susceptibilidad que presenta la enzima silvestre y las enzimas mutantes a la inactivación por acroleína.
5. Identificar el paso limitante de la enzima H2C303V y H2C301T-C303V.
6. Estimar la reactividad de la cisteína catalítica, determinando la actividad de esterasa para ALDH2 y sus mutantes.
7. Evaluar el efecto del estrés oxidante generado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en células de *E. coli* que sobre-expresen a la mutante H2C301T-C303V.

## Materiales y métodos

### Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos para generar las mutantes ALDH2-Cys301Thr-Cys303Val (H2C301T-C303V) y ALDH2-Cys303Val (H2C303V), se diseñaron a partir de la secuencia del gen que codifica para la ALDH2 humana, cada oligonucleótido cuenta con un tamaño de 26 pares de bases (pb) (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño de los oligonucleótidos para la generación de las mutantes H2C303V y H2C301T-C303V. Los codones modificados se muestran en negritas.

|               | Cebadores | Secuencia de nucleótidos                                |
|---------------|-----------|---|
| H2C301T-C303V | Directo   | 5'- AAC CAG GGC CAG <b>ACC</b> TGC <b>GTT</b> GCC G -3' |
|               | Reverso   | 5'- GGA GCC GGC <b>AAC</b> GCA <b>GGT</b> CTG GCC C -3' |
| H2C303V       | Directo   | 5'- AAC CAG GGC CAG TGC TGC <b>GTT</b> GCC GG -3'       |
|               | Reverso   | 5'- GGA GCC GGC <b>AAC</b> GCA GCA CTG GCC CT -3'       |

### Obtención de las mutantes H2C303V y H2C301T-C303V

Las mutaciones puntuales correspondientes a H2C303V y H2C301T-C303V se hicieron en el gen de ALDH2 a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), mediante el método de extensión de cebadores internos (Horton, *et al.*, 1990). Como primer paso se obtuvieron los fragmentos directo y reverso con la mutación deseada, utilizando como DNA molde al gen de la ALDH2 en un volumen de reacción de 100 µL. Una vez generados los fragmentos con la mutación, se realizó una reacción de traslape para obtener el gen completo que codifica para la enzima mutante (Anexo I). Los productos obtenidos de la reacción de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1%.

## **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 (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 eléctrico éste 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 fluoresce al exponerse a la luz UV.

## **Extracción de DNA a partir de geles de agarosa**

Después de separar los fragmentos de DNA correspondientes a la reacción directa, reversa y el traslape en un gel de agarosa, estos se cortaron del gel y se procedió a purificarlos utilizando el sistema de purificación de DNA GeneJET (gel extraction kit, Thermo Scientific)<sup>®</sup>, el cual consta de una solución de yoduro de sodio donde se disuelve el fragmento del gel que contiene el DNA de interés a 55 °C por 10 minutos, posteriormente, esta solución se transfiere a una columna de purificación y se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente. Durante este tiempo, el DNA se une fuertemente a la columna y mediante una centrifugación a 14000 rpm, durante 1 minuto, se elimina del 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 14000 rpm, durante 1 minuto, desechando el filtrado. Finalmente, se eluyó el DNA con 30 µL de amortiguador de elución (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) centrifugando a 14000 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/ $\mu$ L de DNA de doble cadena.

### **Ligación de los genes con la mutación al vector de sobreexpresión pET-45b**

Una vez obtenido el DNA con las mutaciones correspondientes, se realizaron reacciones de restricción con las enzimas Age I y Hind III, con el fin de generar extremos cohesivos y poder insertar las secuencias al vector de sobre-expresión pET-45b, 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 gene, se adicionó a la proteína una etiqueta de histidinas en el extremo amino, lo cual es una herramienta para su posterior purificación. La relación inserto-vector para la ligación fue 2:1 (Anexo I).

### **Transformación en células DH5- $\alpha$**

Una vez realizada la reacción de ligación inserto-vector, se transformaron células de *Escherichia coli* de la cepa DH5- $\alpha$ , con el fin de amplificar las construcciones realizadas. Para esto, se utilizó el kit TransformAid Bacterial Transformation (Thermo Scientific). Un día antes de la transformación se inocularon 10 mL de medio LB (compuesto por 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl, disueltos en un litro de agua) con una colonia de *E. coli* DH5- $\alpha$ , 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  $\mu$ g/mL y un tubo con medio C a 37 °C, por 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 150  $\mu$ L 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 14000 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 14000 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 10-100 pg 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 pET-45b 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 plasmídico a partir de cultivos bacterianos**

Las colonias aisladas de la transformación se inocularon en 10 mL de medio LB suplementado con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron toda la noche, a 37°C, con 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 µg/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 tubo se incubó a 37°C y 200 rpm por toda la noche. Al día siguiente, se cosecharon las células centrifugando en tubos eppendorf a 14000 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 µg mL<sup>-1</sup> 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 14000 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L de dicha solución y nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos. Finalmente, el DNA plasmídico se eluyó con 30  $\mu$ L de amortiguador de elución (100 mM Tris-HCl (pH 7), 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 realizada la purificación del DNA plasmídico, se realizó una digestión con la enzima Sma I para la mutante H2C303V y con las enzimas de restricción Hind III y Nco I para la mutante H2C301T-C303V, con el fin de verificar si las clonas seleccionadas contenían o no el inserto de interés. Las reacciones de restricción se llevaron a cabo en un volumen final de 20  $\mu$ L y se incubaron a 37°C por 2 horas (Anexo I). Al término del periodo de incubación las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% a 90 volts por 45 minutos.

### **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 reportada para el gen de la ALDH2 humana, con el fin de evidenciar que la construcción realizada, únicamente contara con la mutación esperada.

### **Obtención de células competentes**

Para generar células competentes, se realizó un cultivo de células de *E. coli* de la cepa BL21 en medio LB, 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 14000 rpm por 10 minutos a 4°C. El botón se resuspendió en 33 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M estéril a 4°C, dicha suspensión se incubó a 4°C durante 1 hora y las células se cosecharon nuevamente por centrifugación a 14000 rpm por 10 minutos. Finalmente el botón se resuspendió en 2 mL de una mezcla de CaCl<sub>2</sub> 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.

### **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 plaquearon 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.

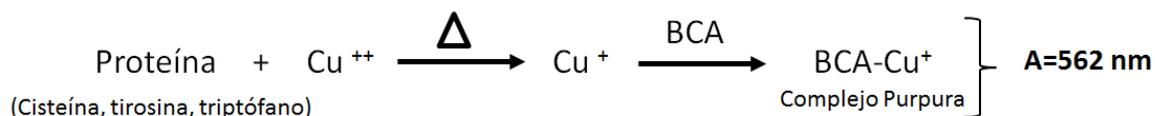
## **Expresión y purificación de la proteína recombinante**

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 por 16 g de extracto de levadura, 10 g de triptona y 5 g de cloruro de sodio, disueltos 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 Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (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 min y se realizaron 2 lavados con 100 mL de NaCl 0.9% cada uno. Las células se resuspendieron en un amortiguador conteniendo fosfato de sodio 50 mM pH 7.5, 500 mM NaCl y 20 mM 2-mercaptoetanol (amortiguador 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 amortiguador A a 4°C. La columna se lavó con 50 mL de amortiguador 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 amortiguador 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  $\mu$ L. La cuantificación se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (BCA), cuyo fundamento se basa en la formación de un complejo púrpura intenso, al reaccionar el ácido bicinconínico con iones  $\text{Cu}^{1+}$  en un medio alcalino.



Se preparó una curva patrón con diferentes concentraciones de albumina de suero bovino (BSA) (5-100  $\mu$ g de proteína total); posteriormente, se añadieron 2 mL de la mezcla de reacción (Mezcla 12:1 del reactivo A y B. Reactivo A; 750 mM carbonato de sodio, 87 mM tartrato de sodio, 120 mM BCA, pH 11.25 y 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**

Para realizar el seguimiento de la purificación, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (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 en baño maría. 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% en agua. 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.

### **Análisis cinético**

#### **Caracterización cinética**

La actividad enzimática de ALDH se determinó en un amortiguador de fosfato de sodio 100 mM (pH 7.4) a 25°C, en presencia de 2 mM de NAD<sup>+</sup> usando un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1800). La reacción se inició con la adición del aldehído correspondiente midiendo 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 la ecuación de inhibición por sustrato. Para dicho análisis se utilizó el software Microcal Origin v.8.0.

#### **Ecuación de Michaelis-Menten**

$$v = \frac{V_m \times S}{K_m + S}$$

#### **Ecuación de inhibición por sustrato**

$$v = \frac{V_m \times [B]}{K_{mB} \left( 1 + \left( \frac{K_{ia} \times K_{mB}}{[A]} \times \left( 1 + \frac{[B]}{K_i} \right) \right) \right) + [B] \left( 1 + \left( \frac{K_{mA}}{[A]} \times \left( 1 + \frac{[B]}{K_i} \right) \right) \right)}$$

## **Análisis de la estabilidad de las diferentes enzimas**

### **Desnaturalización por temperatura**

Para efectuar el ensayo de estabilidad, se incubaron 50 µg de cada enzima a distintas temperaturas (35, 45 y 50 °C), tomando alícuotas a diferentes tiempos para medir la actividad remanente a concentración saturante de propionaldehído (0.1 mM) y NAD<sup>+</sup> (2 mM) a 25 °C. El tiempo 0 representó el 100 % de la actividad remanente.

### **Desnaturalización por urea**

La estabilidad estructural de la proteína se determinó a través de un ensayo de desnaturalización por urea. Para esto se incubaron 40 µg de cada enzima en diferentes concentraciones de urea (0-7 M) en amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 7.4) a 25 °C durante 2 horas. El cambio en la fluorescencia intrínseca fue determinado usando un espectrofluorómetro (Aminco Bowman Series2). La longitud de excitación usada fue 290 nm ya que aquí se registra el pico máximo de excitación para esta enzima y el espectro de emisión se registró en un intervalo de 300 a 400 nm, tomando el valor de fluorescencia a 336 nm.

### **Evaluación de susceptibilidad a acroleína**

Para determinar la susceptibilidad que presentan ALDH2, H2C303V y H2C301T-C303V a acroleína, se incubaron 5-10 µg de proteína en 100 µL de amortiguador compuesto de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 a diferentes concentraciones de acroleína (0.05 - 1 mM) durante 5 min. 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 2 mM de NAD<sup>+</sup> y 1 mM de propionaldehído. Finalmente, con el fin de evaluar el efecto de protección que ejercen los sustratos contra el daño producido por la acroleína, se incubaron 5-10 µg de proteína en presencia de NADH 1 mM y/o propionaldehído 1 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 este aldehído tóxico.

### **Determinación de la sensibilidad a magnesio ( $Mg^{2+}$ )**

Este ensayo se evaluó midiendo la actividad enzimática en presencia y ausencia de 2 mM de cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), esto se hizo en presencia de 2 mM de  $NAD^+$  y 1 mM de propionaldehído. Para realizar la comparación se tomó el porcentaje de actividad respecto a la condición sin  $MgCl_2$ . Esto también se hizo midiendo la actividad enzimática con algunos aldehídos sustituidos (acetaldehído deuterado, cloro-acetaldehído y metoxi-acetaldehído), en condiciones saturantes de sustratos, de igual forma para hacer la comparación se tomó como 100% la actividad con acetaldehído

### **Ensayo de protección de células de *E. coli* BL21 del estrés oxidante generado por $H_2O_2$**

Para evaluar el efecto que ejerce la expresión de la enzima mutante contra el daño generado por el estrés oxidante, se midió el crecimiento en células de *E. coli* BL21 expuestas a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0, 2 y 5 mM). Este ensayo se realizó en células, que contenían tres construcciones distintas: (1) ALDH2, que expresan la enzima silvestre; (2) H2C301T-C303V que expresan la mutante y (3) pET-45b, que únicamente cuentan con el vector de sobre-expresión. El experimento se realizó incubando a las células en medio mínimo (M9) (100 mM  $Na_2HPO_4$ , 20 mM  $KH_2PO_4$ , 10 mM NaCl, 20 mM  $NH_4Cl$ , pH 7.4), para evitar que el peróxido de hidrógeno reaccione con los componentes orgánicos de un medio rico como lo es el medio LB. El crecimiento se midió determinando la densidad óptica a 600 nm cada hora hasta alcanzar el estado estacionario del crecimiento en las células control, las cuales se incubaron sin  $H_2O_2$ . El  $H_2O_2$  se adicionó a las 3 horas de inocular el cultivo, durante la fase de crecimiento. Finalmente, se cosecharon

las células y se rompieron por sonicación. En el extracto se midió la actividad de ALDH con 1 mM de propionaldehído y 2 mM de  $\text{NAD}^+$ , se cuantificó la proteína por el método del ácido biciconinico previamente descrito, y se calculó la actividad máxima en el extracto.

## Resultados

### Biología Molecular

#### Obtención de los genes de las enzimas mutadas

Tras diseñar los oligonucleótidos que contuviesen el cambio de los pares de bases adecuados para generar la enzima mutante, se obtuvieron los fragmentos directos e inversos mediante PCR, utilizando el método de extensión de primers internos. En la mutante ALDH2-Cys303Val (H2C303V), el tamaño de los fragmentos fue de 800 pb para la reacción directa y 730 pb para la reacción reversa (Figura 11A y 11B). Para la mutante ALDH2-Cys301Thr-Cys303Val (H2C301T-C303V), los fragmentos obtenidos fueron de 840 pb para la reacción directa y de 680 pb para la reacción reversa (Figura 11C y 11D).

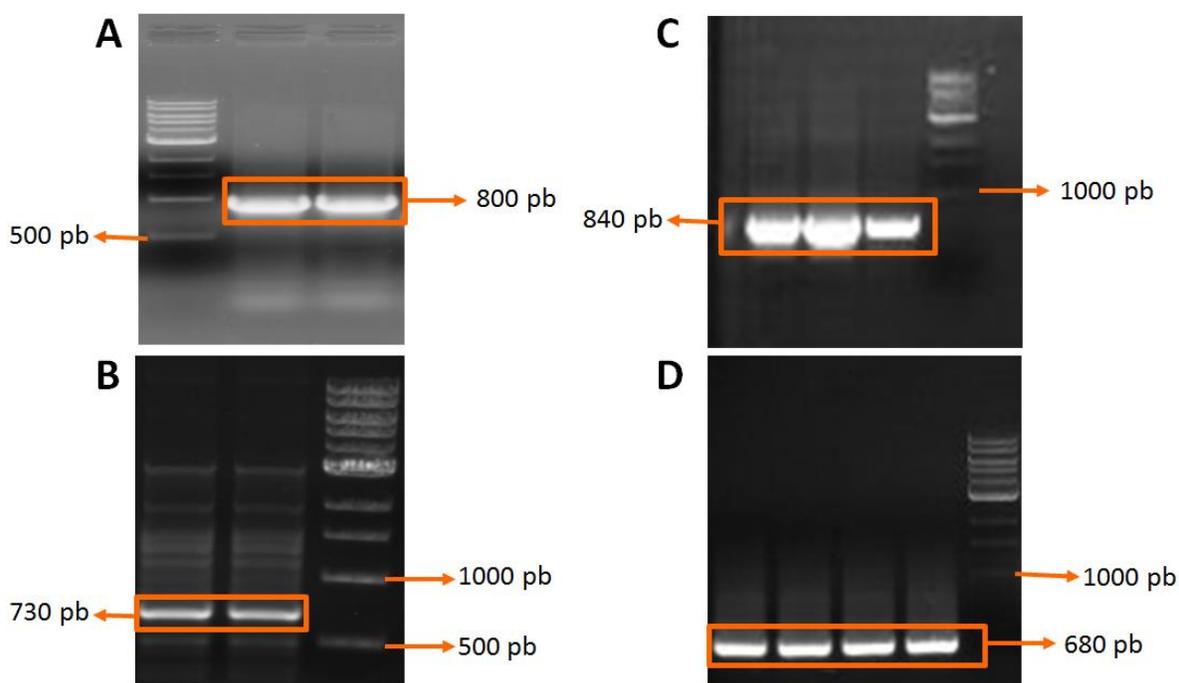


Figura 11. Resultados del análisis de electroforesis de los productos de las reacciones de PCR, para la obtención de las mutantes. Para la enzima H2C303V: (A) Fragmento directo, 800 pb; (B) Fragmento reverso, 730 pb. Para la enzima H2C301T-C303V: (C) Fragmento directo, 840pb; (D) Fragmento reverso, 680 pb. El primer carril de la figura A y el último carril de las figuras B, C y D corresponden al marcador de peso molecular (1 kb).

Tras obtener los fragmentos (directo y reverso) de cada una de las mutantes, se realizó el traslape de éstos y se amplificó el gen completo correspondiente a 1520 pb, para ambas mutantes (Figura 12).

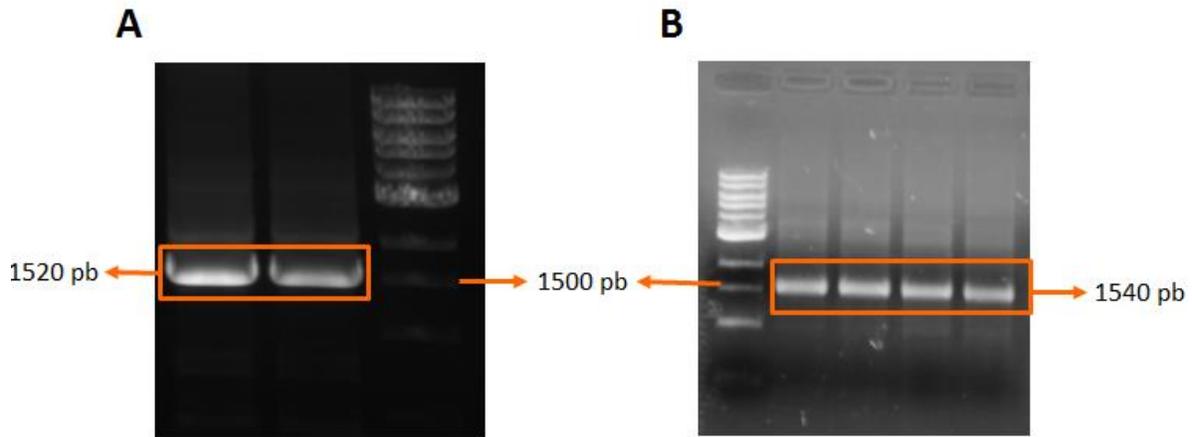


Figura 12. Resultados del análisis de electroforesis de la amplificación del gen completo para ambas mutantes. (A) H2C303V; (B) H2C301T-C303V. El último carril de la figura A y el primer carril de la figura B corresponden al marcador de peso molecular (1 kb).

### Ligación del gen al vector de clonación y transformación en células DH5- $\alpha$

El inserto de DNA obtenido previamente por traslape de los fragmentos directo y reverso, se purificó del gel y se cortó con las enzimas de restricción Hind III y Age I para ligarlo al vector de sobre expresión pET-45b. Con esta construcción se transformaron células de *Escherichia coli* de la cepa DH5- $\alpha$  para amplificar al plásmido con el gen de interés. Para seleccionar las clonas que contenían el plásmido, la mezcla de transformación se extendió en cajas con medio LB más ampicilina, ya que la selección se da por resistencia a este antibiótico, pues el plásmido contiene el gen que codifica para la enzima  $\beta$ -lactamasa, la cual rompe el anillo  $\beta$ -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- $\alpha$ , se sembraron 3 en medio LB líquido con ampicilina (100  $\mu$ g/mL)

para purificar los plásmidos. De estos, se realizó un análisis de restricción para identificar los plásmidos que contuvieran el inserto correspondiente al gen con la mutación. La identidad de la mutante H2C303V se evaluó a partir de una digestión con la enzima Sma I, generando dos fragmentos de 5938 pb y otro de 774 pb; mientras que la identidad de la mutante H2C301T-C303V se evaluó con las enzimas de restricción Hind III y Nco I, generando dos fragmentos de DNA correspondientes a 5150 pb y 1617, respectivamente. En la figura 13, 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.

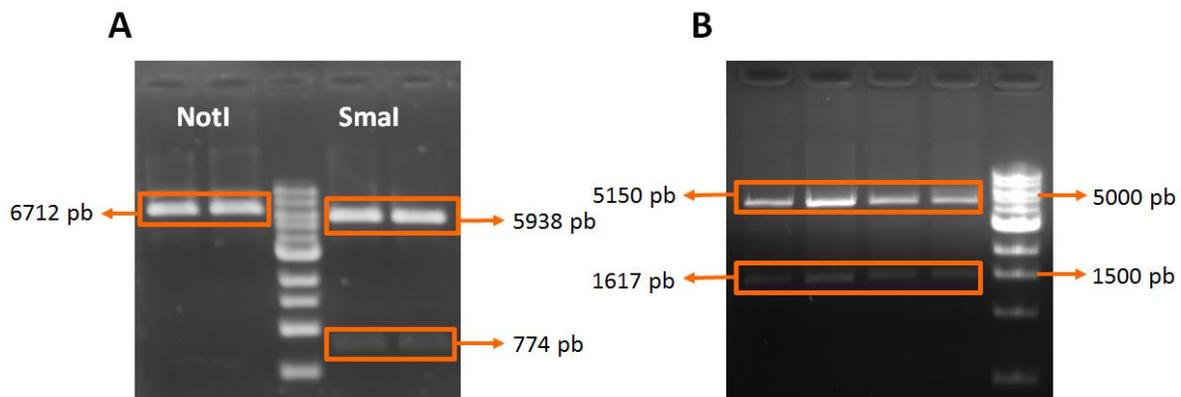


Figura 13. Análisis de restricción de los plásmidos. (A) Digestión del plásmido correspondiente a la mutante H2C303V con la enzima de restricción Not I y Sma I. (B) Digestión del plásmido correspondiente a la mutante H2C301T-C303V con las enzimas de restricción Hind III y Nco I (Anexo I, Figura 24). En los recuadros se muestran las bandas con los fragmentos generados después de la restricción y en el último carril la migración del marcador de peso molecular (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 secuencia reportada para el gen de la ALDH2 humana. De la comparación de ambas mutantes con la



la purificación de las proteínas mutantes fue de 7.5 y 8 mg/L de cultivo para H2C303V y H2C301T-C303V, respectivamente.



Figura 15. Electroforesis del gel de poliacrilamida de las proteínas purificadas. Carril 1, marcador de peso molecular; Carril 2; ALDH2; Carril 3, H2C303V; Carril 4, H2C301T-C303V.

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 H2C303V y H2C301T-C303V presentaron un 92 y 93% de pureza, respectivamente, por lo cual el valor de actividad obtenido posteriormente se corrigió de acuerdo a esta pureza para evitar la subestimación de los datos.

## Cinética enzimática

### Estabilidad de la proteína

Con el fin de evaluar la estabilidad estructural de las proteínas mutantes, se realizó un perfil de inactivación por temperatura y se comparó con la ALDH2. A este respecto, se pudo observar que las mutantes generadas (H2C303V y H2C301T-C303V), poseen el mismo perfil de termoestabilidad, pues no presentan cambios significativos al ser comparadas con la enzima silvestre (Figura 16 A). Lo anterior indica que no hubieron modificaciones en el arreglo estructural del sitio activo en las enzimas mutadas, pues la capacidad catalítica remanente en cada caso fue la misma. Por otro lado, se evaluó la estabilidad global de la proteína mediante un ensayo de desnaturalización a diferentes concentraciones de urea, midiendo la fluorescencia intrínseca de la proteína. Los resultados obtenidos refuerzan los datos generados en el ensayo de termoestabilidad, pues tanto las enzimas mutantes como la enzima silvestre muestran el mismo perfil de desnaturalización, lo cual indica que no se afectó la estabilidad global de la proteína debido a las mutaciones realizadas (Figura 16 B).

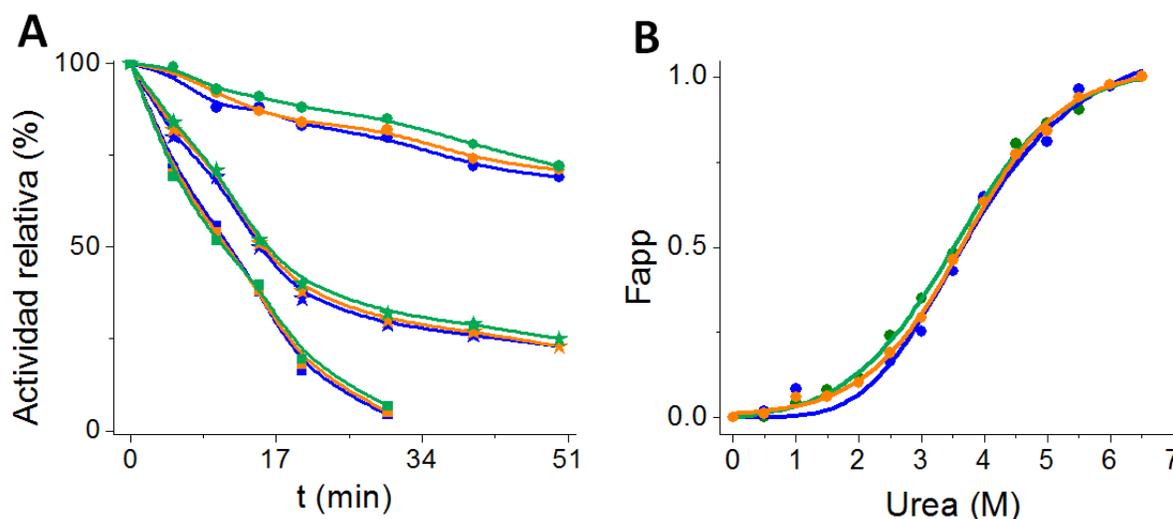


Figura 16. Determinación de la estabilidad de la enzima ALDH2 y las enzimas mutantes H2C303V y H2C301T-C303V. (A), desnaturalización por temperatura a ●, 35; ★, 45; y ■, 50 °C (●, ALDH2; ●, H2C303V; ●, H2C301T-C303V); (B), desnaturalización por urea (●, ALDH2; ●, H2C303V; ●, H2C301T-C303V).

## Susceptibilidad de las enzimas a la inactivación por los aldehídos lipídicos

Tras purificar las enzimas, primero se evaluó la actividad con propionaldehído, ya que es un sustrato que la enzima silvestre toma con alta afinidad y, además, ALDH2 no se inactiva por este aldehído. Posteriormente, se midió la actividad con los aldehídos lipídicos, para comparar la susceptibilidad que presentaban las enzimas mutantes respecto a la enzima silvestre. Al realizar los gráficos de la actividad enzimática en función de la concentración de sustrato, se observó que la ALDH2 comienza a inactivarse a una concentración de 5  $\mu\text{M}$  de acroleína y 1  $\mu\text{M}$  de 4-HNE (Figura 17A y 17D), mientras que la enzima H2C303V comienza a inactivarse a concentraciones por arriba de 25  $\mu\text{M}$  de acroleína y 5  $\mu\text{M}$  de 4-HNE, resistiendo 5 veces más la inactivación por estos aldehídos tóxicos (Figura 17B y 17E). Por su parte, la mutante H2C301T-C303V mantuvo su actividad a concentraciones 1000 y 500 veces más altas de estos compuestos tóxicos, ya que comenzó a inactivarse a concentraciones por arriba de 5 mM de acroleína y 500  $\mu\text{M}$  de 4-HNE (Figura 17C y 17F).

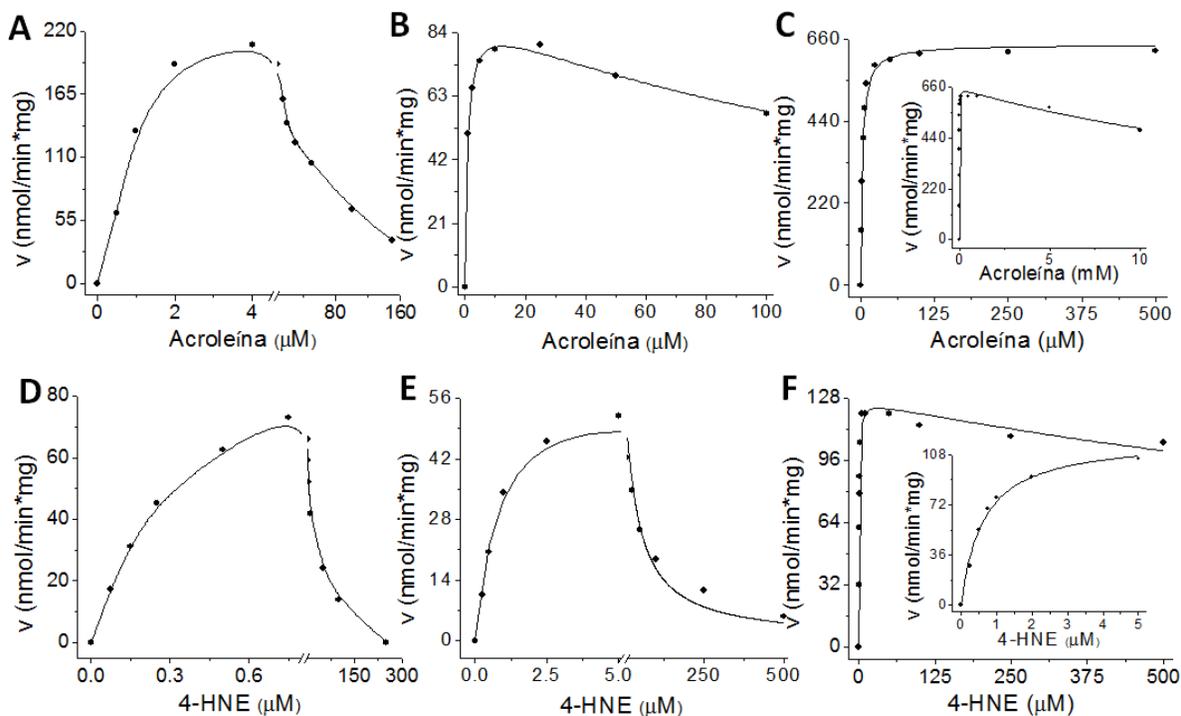


Figura 17. Curvas de saturación de ALDH2 y sus mutantes con acroleína y 4-HNE. (A) y (D), ALDH2; (B) y (E), H2C303V; (C) y (F), H2C301T-C303V.

Por otro lado, la ALDH2 no presentó actividad con 2-alquenas de cadena mediana (2-hexenaldehído y 2-nonenaldehído), ya que se inactiva a bajas concentraciones de estos aldehídos tóxicos. Se probaron concentraciones de estos aldehídos de 0.1-1  $\mu\text{M}$ , después de la adición de la enzima y  $\text{NAD}^+$  sin observarse actividad (Figura 18A). En un segundo experimento, cuando se adicionó una concentración de 1  $\mu\text{M}$  de cualquiera de estos dos aldehídos, mientras la enzima se encontraba en catálisis con propionaldehído, se perdió la actividad de la enzima inmediatamente, lo que nos indica que tanto el 2-hexenaldehído como el 2-nonenaldehído son inactivantes potentes de ALDH2 (Figura 18B). Por el contrario, las enzimas mutantes catalizaron la oxidación de ambos aldehídos, resistiendo el efecto inactivador observado en la enzima silvestre. La enzima mutante H2C303V, mantuvo la actividad a concentraciones de hasta 50  $\mu\text{M}$  de 2-hexenaldehído y 25  $\mu\text{M}$  de 2-nonenaldehído (Figuras 19A y 19B), mientras que la mutante H2C301T-C303V resistió concentraciones mayores a 1 mM de ambos sustratos (Figuras 19C y 19D). Siendo H2C301T-C303V la mutante más resistente al efecto inactivante de los productos de la peroxidación lipídica.

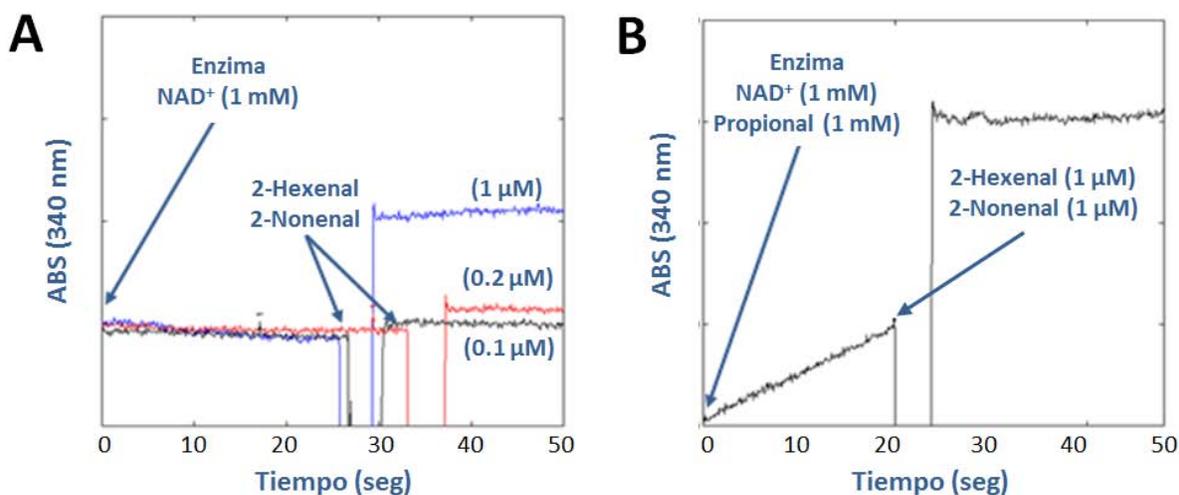


Figura 18. Inactivación de la ALDH2 con 2-hexenaldehído y 2-nonenaldehído. (A), adición de diferentes concentraciones de ambos aldehídos para buscar la actividad; (B), adición de 0.1  $\mu\text{M}$  de ambos aldehídos durante la catálisis de la enzima.

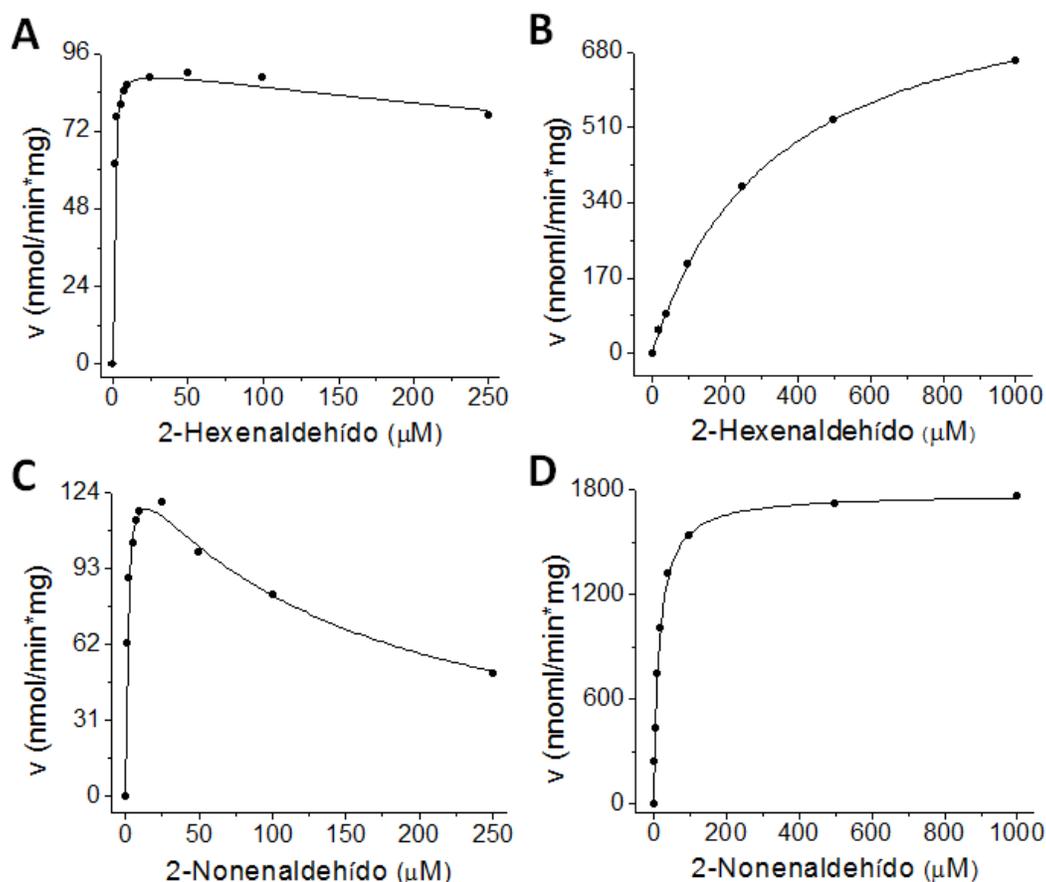


Figura 19. Curvas de saturación de las enzimas mutantes con 2-hexenaldehído y 2-nonenaldehído. (A) y (C), H2C303V; (B) y (D), H2C301T-C303V.

Para analizar más a detalle la susceptibilidad de las enzimas a la acroleína, se realizó un perfil de inactivación de éstas, incubando a la enzima sin  $\text{NAD}^+$  con este aldehído por 5 minutos y midiendo la actividad remanente al término del tiempo de incubación con  $\text{NAD}^+$  y propionaldehído saturantes. Los resultados revelaron que las tres enzimas comenzaron a inactivarse desde la primera concentración probada de acroleína ( $1 \mu\text{M}$ ), mientras que a una concentración de  $500 \mu\text{M}$ , presentaron el 25% de la actividad remanente (Figura 20A). Posteriormente, se evaluó el efecto de protección que podrían ejercer el  $\text{NADH}$  y el aldehído sobre el sitio activo de la proteína (sitio de unión del  $\text{NAD}^+$  y sitio de unión del aldehído) ante la inactivación por acroleína. A este respecto, se observó que  $1 \text{ mM}$  de  $\text{NADH}$

protege 25, 50 y 70%, a las enzimas ALDH2, H2C303V y H2C301T-C303V, respectivamente (Figura 20B). Estos datos sugieren que el sitio de unión del NAD<sup>+</sup> también es blanco de la inactivación por acroleína, ya que este sitio es protegido por la presencia del análogo del sustrato. A ese respecto, nuestro grupo ha propuesto que un residuo de Lys expuesto en el sitio de unión del NAD<sup>+</sup> puede ser el blanco de reacción de los aldehídos lipídicos; el análisis de la unión del NAD<sup>+</sup> a la enzima indica que este residuo está involucrado en la formación de un puente de hidrógeno con la coenzima para estabilizarla (Yoval-Sánchez *et al.*, 2012). Este residuo podría estar formando un aducto con la acroleína y al estar presente el NADH este residuo se protege. Es importante remarcar que no hay catálisis enzimática con el NADH, ya que éste es un producto de la reacción, la cual no es reversible. La incubación con 100 µM de propionaldehído no tuvo efecto protector sobre la inactivación de ALDH2, pero si protegió en un 5% y 30% la actividad de H2C303V y H2C301T-C303V, respectivamente (Figura 20B). El hecho de que el propionaldehído no proteja a la ALDH2 de la inactivación por la acroleína se debe a que este aldehído tóxico reacciona con las cisteínas adyacentes a la cisteína reactiva formando aductos, que interfieren con la catálisis. Aunado a esto es importante recordar que el sitio de unión de la coenzima, también puede ser un sitio blanco de los aldehídos tóxicos, como se discutió anteriormente y esto podría explicar el hecho de que las dos mutantes no se protejan en un 100% de la acroleína en presencia de propionaldehído.

Finalmente, se determinó el efecto que ejerce la presencia de ambos sustratos (NADH y propionaldehído) sobre la inactivación de la enzima por acroleína. En la ALDH2, la adición de ambos sustratos proporcionó una protección del 50% sobre la actividad enzimática a 0.5 mM de acroleína, lo cual representa un 25% más comparado con la enzima incubada en ausencia de sustratos. En la mutante H2C303V, la presencia de ambos sustratos en el medio favoreció su protección, pues esta enzima conservó el 75% de la actividad en presencia de 0.5 mM de acroleína, recuperando el 50% de la actividad respecto a la enzima incubada sin los sustratos (Figura 20D respecto a la figura 20A). De igual forma, en la mutante H2C301T-C303V se observó el 100% de la actividad remanente al

incubar la enzima con ambos sustratos, lo cual representa un 75% más de la actividad comparado con los resultados de inactivación en ausencia de los sustratos (Figura 20D).

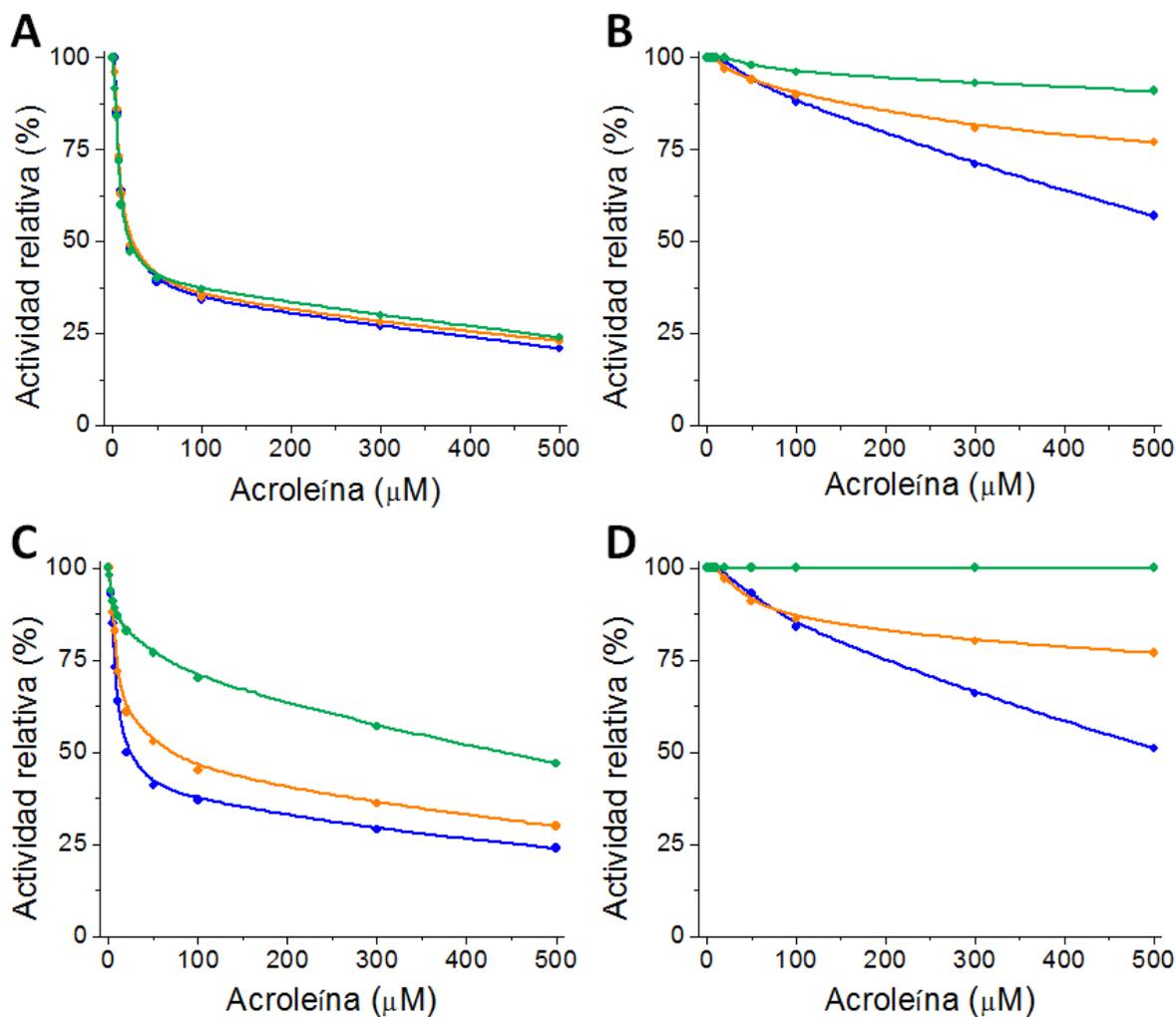


Figura 20. Perfil de inactivación de la enzima silvestre y las mutantes en presencia de acroleína y protección por los sustratos. (A), perfil de inactivación de las enzimas por acroleína; (B), perfil de inactivación de las enzimas incubadas a concentración saturante de propionaldehído (100 μM); (C), perfil de inactivación de las enzimas incubadas con 1 mM de NADH; (D), perfil de inactivación de las enzimas incubadas con 1mM de NADH y 100 μM de propionaldehído (●, ALDH2; ●, H2C303V; ●, H2C301T-C303V).

La protección ejercida por la adición conjunta de los sustratos al medio de incubación, indica que el blanco (o blancos) de inactivación se encuentra(n) en el sitio activo 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 o la reacción con la lisina del sitio de unión del  $\text{NAD}^+$ .

### **Caracterización cinética**

Se determinaron los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$  y  $K_i$ , que presenta ALDH2, H2C303V y H2C301T-C303V por aldehídos saturados como: acetal, propional, hexanal y nonanal e insaturados como: acroleína, 2-hexenal, 2-nonenal y 4-HNE. Lo anterior, se realizó con el fin de determinar si cambió la especificidad que presentan las enzimas mutantes por cada grupo de aldehídos, comparado con la enzima silvestre, debido a los cambios realizados en el sitio activo. Los resultados mostraron que para H2C301T-C303V los valores de  $K_m$  por aldehídos alifáticos aumentan 2 y 5 veces por acroleína y propional, y 60 veces por acetal y hexanal, respectivamente, pero ésta no cambia por 4-HNE en comparación con ALDH2 (Tablas 3 y 4). Así mismo, los valores de  $k_{cat}$  incrementan por algunos aldehídos saturados de cadena mediana, 4 y 7 veces por hexenal y nonenal, respectivamente, mientras que disminuye a la mitad por los aldehídos de cadena corta como propional y acetal. Con respecto a los aldehídos insaturados, como se mencionó anteriormente, ALDH2 no puede utilizarlos, ya que la enzima es inactivada por éstos aún a concentraciones submicromolares. En este caso, las dos mutantes mostraron actividad con 2-hexenal y 2-nonenal, siendo la actividad de la doble mutante 34 y 37 veces mayor por estos sustratos, respectivamente comparado con la mutante sencilla (Tabla 4). Por otro lado, debido al incremento en la  $k_{cat}$ , el valor del cociente  $k_{cat}/K_m$ , se conserva para los aldehídos lipídicos, por lo que la mutante H2C301T-C303V, además de ser resistente a la inactivación provocada por dichos aldehídos, sigue siendo una enzima con eficiencia catalítica muy alta (Tabla 4).

La mutante H2C303V a pesar de ser resistente al efecto inactivador de los aldehídos lipídicos, presentó eficiencias catalíticas ( $k_{cat}/K_m$ ) entre 20-150 veces más bajas por los aldehídos saturados y entre 2-3 veces menores por aldehídos insaturados, respecto a la ALDH2 y H2C301T-C303V (Tablas 3 y 4). Esta disminución en la eficiencia que presenta H2C303V es un reflejo de la disminución en  $k_{cat}$  que presenta por todos los aldehídos evaluados, ya que ésta decayó entre 2-5 veces respecto a la enzima silvestre y 2-40 veces respecto a la mutante H2C301T-C303V (Tablas 3 y 4). Los cambios en los parámetros cinéticos que presentan ambas enzimas mutantes, probablemente se deben a la modificación del ambiente hidrofóbico que rodea a dicho residuo. También se podrían deber a un cambio en el paso limitante de la reacción, pues de éste, depende la velocidad con la que ocurre la reacción.

En las tablas 3 y 4 se muestra el resumen de los parámetros cinéticos obtenidos para ALDH2, H2C303V y H2C301T-C303V por los aldehídos saturados e insaturados.

Tabla 3. Parámetros cinéticos calculados para la ALDH2, H2C303V y H2C301T-C303V por aldehídos saturados.

|   |               | Aldehídos Saturados |               |               |               |               |
|---|---------------|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|   |               | Acetal              | Propional     | Butanal       | Hexanal       | Nonanal       |
| $K_m$ ( $\mu\text{M}$ )                                 | ALDH2         | $0.4 \pm 0.1$       | $0.5 \pm 0.1$ | $0.7 \pm 0.1$ | $1.1 \pm 0.2$ | $0.5 \pm 0.1$ |
|   | H2C303V       | $16 \pm 4$          | $2.2 \pm 0.2$ | $3 \pm 0.5$   | $11 \pm 2$    | $18 \pm 3$    |
|   | H2C301T-C303V | $28 \pm 7$          | $3.4 \pm 0.4$ | $8 \pm 0.3$   | $84 \pm 4.1$  | $3.5 \pm 0.3$ |
| $k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )                         | ALDH2         | $119 \pm 10$        | $113 \pm 11$  | $113 \pm 14$  | $113 \pm 7$   | $113 \pm 5$   |
|   | H2C303V       | $30 \pm 5$          | $25 \pm 4$    | $23 \pm 5$    | $59 \pm 8$    | $27 \pm 4$    |
|   | H2C301T-C303V | $60 \pm 6$          | $120 \pm 15$  | $71 \pm 6$    | $452 \pm 36$  | $786 \pm 156$ |
| $k_{cat}/K_m$<br>( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ) | ALDH2         | $298 \pm 32$        | $226 \pm 25$  | $161 \pm 15$  | $103 \pm 10$  | $226 \pm 23$  |
|   | H2C303V       | $2 \pm 0.3$         | $11 \pm 1$    | $8 \pm 1$     | $5.4 \pm 0.6$ | $2 \pm 0.2$   |
|   | H2C301T-C303V | $2.2 \pm 0.3$       | $35 \pm 3$    | $9 \pm 0.4$   | $5.4 \pm 0.3$ | $225 \pm 24$  |

Tabla 4. Parámetros cinéticos determinados para la ALDH2, H2C303V, H2C301T-C303V por aldehídos insaturados (aldehídos lipídicos).

|   |               | Aldehídos Insaturados |                |               |               |
|---|---------------|-----------------------|----------------|---------------|---------------|
|   |               | Acroleína             | 2-Hexenal      | 2-Nonenal     | 4-HNE         |
| $K_m$ ( $\mu\text{M}$ )                                 | ALDH2         | $1.3 \pm 0.2$         | ND             | ND            | $0.8 \pm 0.2$ |
|   | H2C303V       | $1 \pm 0.3$           | $0.5 \pm 0.2$  | $1.4 \pm 0.3$ | $0.9 \pm 0.1$ |
|   | H2C301T-C303V | $3.1 \pm 0.1$         | $379 \pm 38$   | $17.3 \pm 2$  | $0.6 \pm 0.2$ |
| $k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )                         | ALDH2         | $60 \pm 5$            | ND             | ND            | $24 \pm 4$    |
|   | H2C303V       | $22 \pm 6$            | $21 \pm 4$     | $31 \pm 5$    | $15 \pm 3$    |
|   | H2C301T-C303V | $140 \pm 10$          | $715 \pm 29$   | $1146 \pm 95$ | $29 \pm 4$    |
| $k_{cat}/K_m$<br>( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ) | ALDH2         | $45 \pm 4$            | ND             | ND            | $30 \pm 5$    |
|   | H2C303V       | $22 \pm 5$            | $42 \pm 9$     | $22 \pm 8$    | $17 \pm 2$    |
|   | H2C301T-C303V | $45 \pm 2$            | $2 \pm 0.1$    | $66 \pm 5$    | $48 \pm 8$    |
| $K_i$ ( $\mu\text{M}$ )                                 | ALDH2         | $23 \pm 4$            | $< 0.1$        | $< 0.1$       | $7.3 \pm 2.7$ |
|   | H2C303V       | $185 \pm 34$          | $1484 \pm 103$ | $143 \pm 11$  | $35 \pm 5$    |
|   | H2C301T-C303V | $77250 \pm 8103$      | $> 1000$       | $> 1000$      | $1963 \pm 20$ |

ND. No detectable  $< 1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$

### Paso limitante de la reacción

Como se mencionó en la introducción de la tesis dentro de la sección del mecanismo cinético de reacción de las aldehído deshidrogenasas (páginas 11 y 12), a pesar de que todas las isoformas de ALDH presentan el mismo mecanismo cinético, cada una difiere en el paso limitante de la reacción, siendo la liberación del acilo el paso limitante para la ALDH2 humana (Figura 21A). Para esta parte del proyecto se evaluó el paso limitante de la reacción en las enzimas mutantes de la ALDH2 con el fin de explicar los cambios en los parámetros cinéticos mostrados previamente. Sabiendo que el paso limitante de la reacción para la enzima silvestre se encuentra después de la transferencia del hidruro, se determinó el efecto del magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), tanto en la enzima silvestre, como en las enzimas mutantes, pues como se explicó en la introducción, este catión modifica de diferente forma la velocidad de la enzima, dependiendo de la posición del paso

limitante. El ensayo se realizó midiendo la actividad de ambas enzimas a concentraciones saturantes de  $\text{NAD}^+$  y propionaldehído, (1 mM de  $\text{NAD}^+$  en el caso de la enzima silvestre y 2 mM en el caso de las enzimas mutantes y 100  $\mu\text{M}$  de propionaldehído para las tres enzimas), este punto representó el 100% de actividad. Para probar el efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  se midió la actividad utilizando concentraciones de 1 y 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Los resultados mostraron que en la ALDH2 se incrementa la actividad en un 200%, en presencia de 2 mM de  $\text{Mg}^{2+}$ , mientras que la actividad de H2C301T-C303V se ve inhibida en un 30% como pasa en ALDH1A1 (Figura 21B), lo que sugiere que el paso limitante cambió de posición de la liberación del acilo a la disociación de la coenzima reducida (Figura 21A). Por otro lado, el  $\text{MgCl}_2$  incrementó en un 50% la actividad de H2C303V, lo que indica que el paso limitante sigue siendo la liberación del acilo para esta enzima (Figura 21A y B), aunque quizá este paso ahora sea menos limitante, pues el porcentaje de activación es menor comparándolo con el obtenido para la enzima silvestre (Figura 21B). Este resultado se contrapone con el de la velocidad máxima obtenida para H2C303V, pues al ser menos limitante la liberación del acilo, se esperaría que la velocidad máxima se incrementara respecto a la enzima silvestre y este efecto no se observa. La disminución en la actividad de esta mutante debe ser un efecto causado por la mutación disminuyendo las constantes parciales de velocidad del mecanismo cinético durante la reacción. Por otro lado, los resultados anteriores sugieren que se requiere del cambio de ambos residuos de cisteína en el sitio de unión del aldehído para promover un cambio en el paso limitante de la reacción.

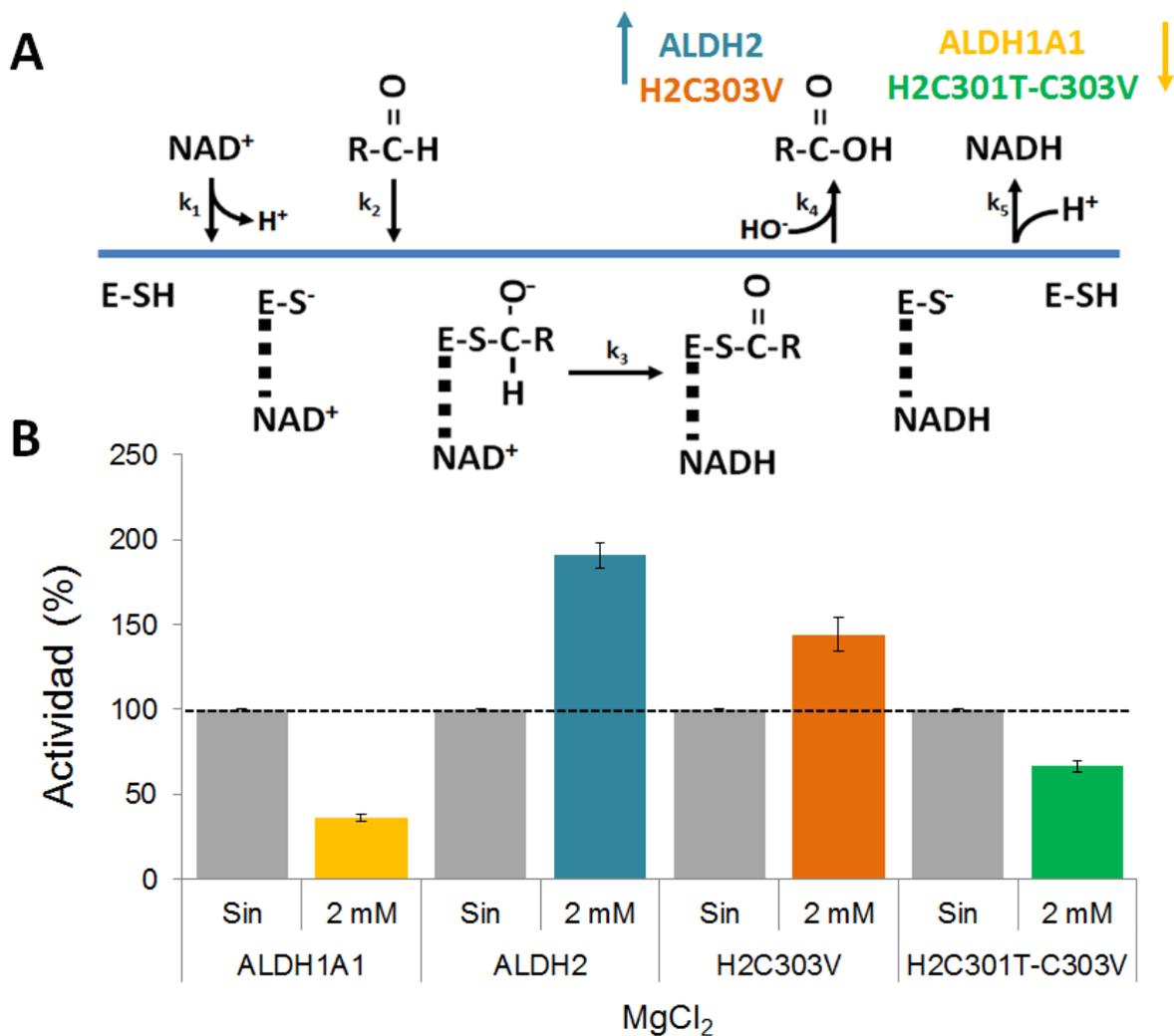


Figura 21. Efecto del  $Mg^{2+}$  sobre la actividad de ALDH1A1, ALDH2 y las dos mutantes. (A), Mecanismo general de reacción de las ALDHs indicando la posición del paso limitante para cada enzima (Rodríguez-Zavala *et al.*, 2006); (B), Gráfico de barras de la actividad de las enzimas en ausencia y en presencia de  $MgCl_2$ .

Para obtener más evidencia sobre el paso limitante de H2C301T-C303V, se evaluó el efecto del acetaldehído deuterado y de algunos aldehídos con grupos sustituyentes aceptores o donadores de electrones. El acetaldehído deuterado no tuvo efecto sobre ALDH1A1, ALDH2 y la enzima mutante H2C301T-C303V, pues en estas enzimas el paso limitante se encuentra después de la transferencia del hidruro, pero este ensayo nos confirmó que éste no es el paso limitante. Por otro lado, el cloracetaldehído activó 1.5 veces a la ALDH2 pues el cloro al ser un grupo

atractor de electrones, incrementa la velocidad de desacilación de la enzima. En H2C301T-C303V y ALDH1A1 la actividad con cloroacetaldehído fue un 25 - 30 % menor que con acetaldehído (Tabla 5). Estos datos en conjunto nos sugieren que el paso limitante de la mutante H2C301T-C303V cambió de la liberación del acilo a la liberación de la coenzima reducida.

Tabla 5. Efecto de algunos aldehídos con sustituyentes sobre la actividad de ALDH1A1, ALDH2 y las mutantes de ALDH2.

|                        | Actividad relativa (% del control) |          |          |               |
|------------------------|------------------------------------|----------|----------|---------------|
|                        | ALDH1A1                            | ALDH2    | H2C303V  | H2C301T-C303V |
| Sin Mg <sup>2+</sup>   | 100                                | 100      | 100      | 100           |
| 2 mM Mg <sup>2+</sup>  | 36 ± 2                             | 191 ± 5  | 144 ± 6  | 70 ± 4        |
| Acetaldehído           | 100                                | 100      | 100      | 100           |
| Cloracetaldehído       | 79 ± 4                             | 250 ± 21 | 183 ± 15 | 75 ± 2        |
| Acetaldehído deuterado | 102 ± 3                            | 103 ± 5  | 101 ± 6  | 103 ± 8       |

### Determinación de la reactividad de la C302 mediante la actividad de esterasa

Se ha establecido que algunas isoformas de ALDH poseen actividad de hidrolisis de ésteres, causando la hidrólisis del p-nitrofenilacetato (p-NFA). Esta actividad de esterasa está dada por la cisteína reactiva (243 en ALDH3A1, y 302 en ALDH1A1 y ALDH2). Se evaluó la actividad de esterasa de las mutantes para determinar si la reactividad de la cisteína catalítica resultó afectada por los cambios de sus aminoácidos adyacentes. En el mecanismo de la reacción de esterasa, primero ocurre el ataque nucleofílico de la cisteína sobre el carbono del grupo carbonilo en el p-NFA, quedando éste unido al grupo sulfhidrilo de la Cys302, para formar un intermediario tioéster, el cual es altamente inestable por lo que, finalmente, ocurre la hidrolisis espontánea, liberando p-nitrofenol. Es posible seguir la actividad de esterasa de la enzima ya que el p-nitrofenol absorbe a 400 nm. La reactividad de la Cys se estima con el valor de la *k<sub>cat</sub>* que presenta la enzima por el p-NFA. En la

reacción de esterasa, ALDH1A1 y ALDH2 presentaron una  $k_{cat}$  de 11.4 y 36  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente, mientras que H2C303V y H2C301T-C303V mostraron valores de 5.3 y 11.8  $\text{min}^{-1}$  (Tabla 6). Este resultado sugiere que la reactividad de la Cys302 en ALDH2 es mayor, comparada con H2C303V y H2C301T-C303V.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de las enzimas con p-NFA.

| Enzima        | p-Nitrofenilacetato     |                                 |  |
|---------------|-------------------------|---------------------------------|--|
|               | $K_m$ ( $\mu\text{M}$ ) | $k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $k_{cat}/K_m$ ( $\text{min}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ) |
| ALDH1A1       | $15 \pm 3$              | $11.4 \pm 1.5$                  | $0.8 \pm 0.1$  |
| ALDH2         | $3 \pm 0.3$             | $35.6 \pm 6.3$                  | $12 \pm 1.5$   |
| ALDH3A1       | $222 \pm 40$            | $5.4 \pm 0.6$                   | $0.02 \pm 0.002$                                     |
| H2C303V       | $6 \pm 1$               | $5.3 \pm 2.2$                   | $0.8 \pm 0.2$  |
| H2C301T-C303V | $9 \pm 1.1$             | $11.8 \pm 1.8$                  | $1.3 \pm 0.2$  |

### Activadores de las ALDHs

Se han reportado algunos activadores de las ALDHs, entre los que destaca el ALDA-1, que es un activador de las ALDH1A1 y ALDH2 humanas. Se ha observado que este compuesto tiene la capacidad de proteger al tejido cardiaco del daño inducido por isquemia-reperfusión y esto se ha asociado al incremento en la actividad de ALDH2 de un 80% debido al activador. El mecanismo de activación del ALDA-1 está relacionado con el incremento en la velocidad de desacilación y con una disminución en la afinidad de la enzima por el NADH, al ser la desacilación el paso limitante de la ALDH2 y la liberación de la coenzima reducida el paso limitante para ALDH1A1, el ALDA-1 puede activar a ambas enzimas. Por otro lado, se ha reportado que el tamoxifen es un activador de la ALDH1A1 pero no de la ALDH2, la activación por este compuesto está relacionada con la disminución en la afinidad de la enzima por el NADH, por lo cual, este compuesto solo activa a la ALDH1A1. Debido a esto y a que probablemente para la mutante H2C301T-C303V cambió el paso limitante, se decidió evaluar el efecto de estos compuestos sobre la actividad de las enzimas mutadas. Los resultados mostraron

que el ALDA-1 aumenta 2 veces la actividad de H2C303V, pero el tamoxifen no ejerce efecto sobre la actividad de esta enzima. De forma interesante, la mutante H2C301T-C303V es activada por el ALDA-1 en un 400%; esto es, 5 veces más que la enzima silvestre, mientras que el tamoxifen aumenta su actividad en un 280%, esto es 3.5 veces más que a la enzima ALDH1A1 con tamoxifen (Figura 22). Es importante recordar que un activador modifica la velocidad del paso limitante, incrementándola, es por este motivo que el ALDA-1 y el tamoxifen tienen efecto sobre la actividad de la enzima H2C301T-C303V, pues ambos compuestos actúan sobre la liberación de la coenzima reducida, el cual es el paso limitante para la H2C301T-C303V y la ALDH1A1. Por el contrario, el tamoxifen no tiene efecto sobre la liberación del acilo, por lo que no ejerce efecto en la velocidad de la ALDH2 y la mutante H2C303V.

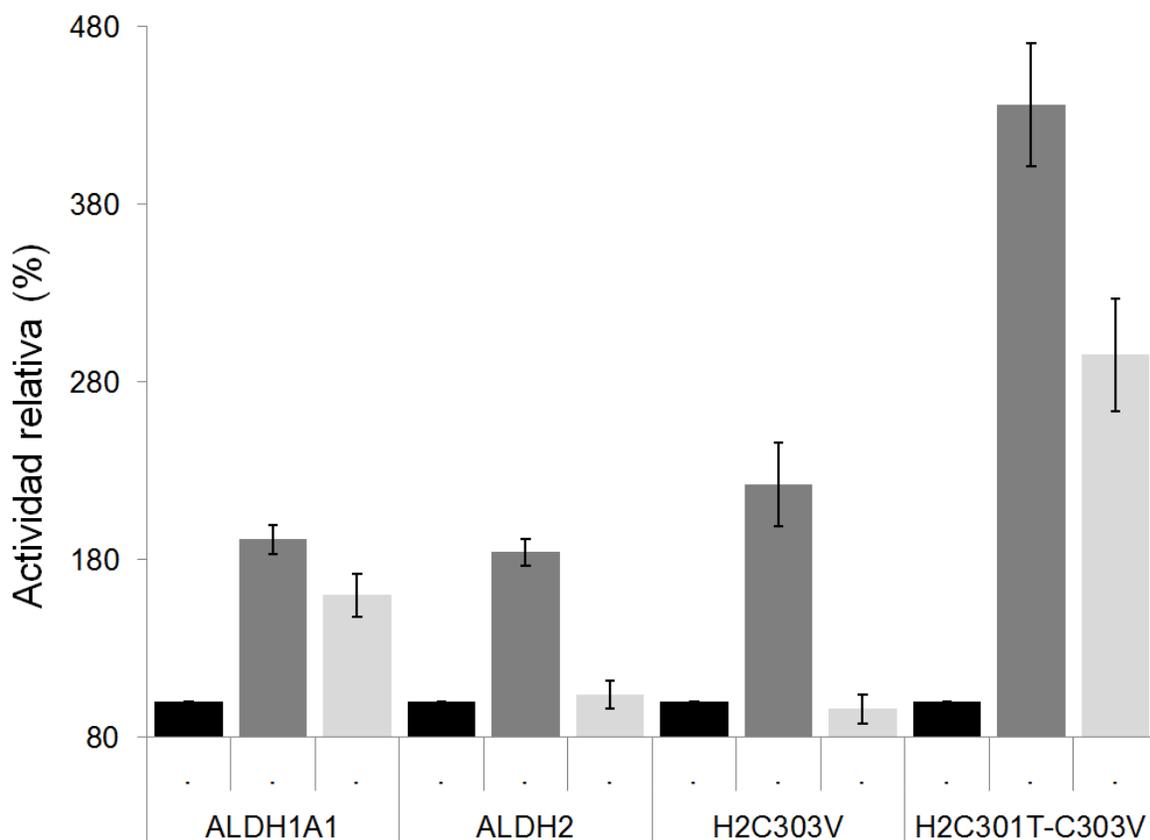


Figura 22. Efecto de los activadores ALDA-1 y tamoxifen sobre la actividad de ALDH1A1, ALDH2, H2C303V y H2C301T-C303V. (■, Sin activador; ■, 15 μM de ALDA-1; ■ 15 μM de tamoxifen).

## Ensayo de protección celular del estrés oxidativo por la expresión de la mutante H2C301T-C303V.

En un ensayo in vivo, se evaluó si la expresión de la enzima mutante H2C301T-C303V protegía a las células de *E. coli*, de la toxicidad generada por la exposición a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Este ensayo se realizó utilizando células de *E. coli* BL21 expuestas a una concentración de 5 mM de  $H_2O_2$ . Las células se transformaron con tres construcciones distintas: 1) plásmido más pET-45 ALDH2, que expresan la enzima silvestre; 2) pET-45 más H2C301T-C303V que expresan la mutante y 3) pET-45 que únicamente cuentan con el vector de sobre-expresión. El experimento se realizó incubando a las células en medio mínimo, para evitar que el  $H_2O_2$  reaccionara con los componentes del medio LB. El crecimiento se midió determinando la densidad óptica a 600 nm cada hora hasta alcanzar el estado estacionario. Como control, las células conteniendo las diferentes construcciones se incubaron sin  $H_2O_2$  (Figura 23A). Las curvas de crecimiento mostraron que las células que expresan la enzima mutante (H2C301T-C303V) son más resistentes que aquellas que expresan la enzima silvestre (Figura 23B).

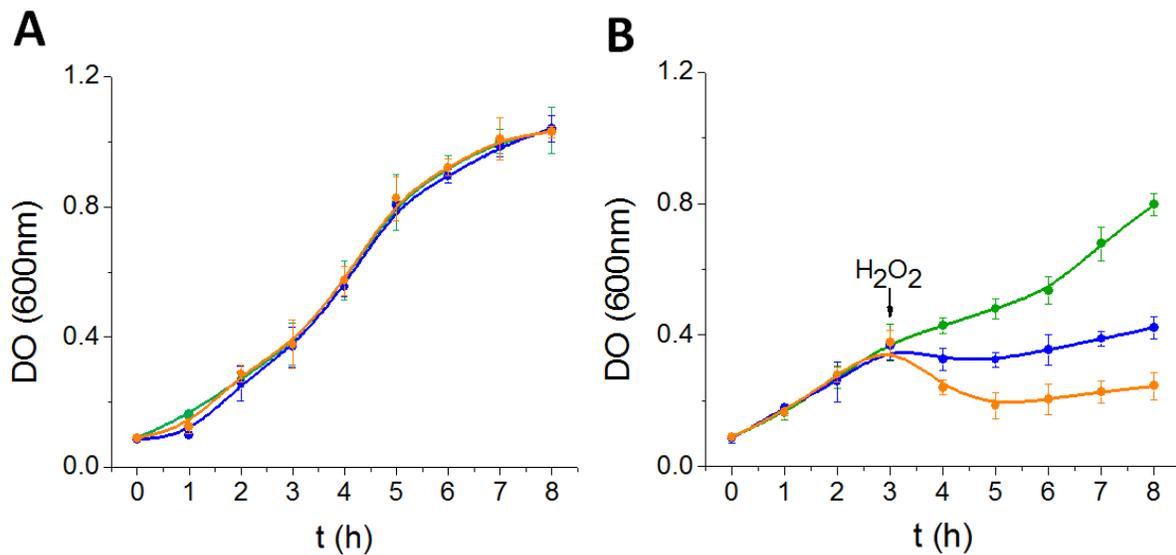


Figura 23. Curvas de crecimiento de *E. coli*. (A), Células no expuestas a estrés; (B), Células expuestas a 5 mM de  $H_2O_2$  (●, ALDH2; ●, H2C303V; ●, H2C301T-C303V).

Las gráficas muestran que parte de las células que expresan la enzima silvestre mueren y/o dejan de crecer durante el pulso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a diferencia de las células que expresan la doble mutante, las cuales resisten este estrés y recuperan rápidamente el crecimiento. Las células que expresan la ALDH2 tardan más tiempo en contender con el estrés generado. Por otro lado, en las células que no sobre-expresan ninguna isoforma de ALDH, la proporción de células que mueren tras la adición del peróxido de hidrógeno es mayor y su recuperación después del estrés es mucho menor.

Finalmente, se cosecharon las células que se incubaron a 0 y 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se rompieron por sonicación. En el extracto se midió la actividad de ALDH y se corrió un gel de SDS-PAGE para comparar la expresión y actividad de las enzimas, en las diferentes clonas. De esta forma se puede descartar que la protección que ejerce la enzima H2C301T-C303V del estrés oxidante, sea debido a que la enzima se está sobreexpresando en mayor grado. Las actividades que se obtuvieron en extractos de las células crecidas sin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fueron muy similares para ALDH2 y H2C301T-C303V, de 13 y 11 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectivamente, mientras que las células pET-45b mostraron una actividad de 1 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, debido a las ALDHs endógenas de la bacteria. En la condición de 5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad de las células control y las que expresan ALDH2 silvestre baja a la mitad, mientras que para las células que expresan H2C301T-C303V, ésta se mantuvo constante (Tabla 7). Lo que sugiere que la protección de las células de *E. coli* es debida a que la enzima H2C301T-C303V resiste el estrés y continua desintoxicando de forma eficiente los aldehídos formados durante la peroxidación lipídica.

Tabla 7. Actividad de ALDH en los extractos celulares de *E. coli*.

| pET-45b  |                                    | ALDH2                             |                                    | H2C301T-C303V                     |                                    |
|--|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| Sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                  | 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Sin H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| <i>V</i> <sub>max</sub> (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ) |                                    |                                   |                                    |                                   |                                    |
| 1.1 ± 0.1  | 0.6 ± 0.2                          | 13.2 ± 1.2                        | 6.5 ± 1.8                          | 10.5 ± 2.1                        | 10.3 ± 1.9                         |

## Discusión general

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 cisteína reactiva (Cys302), involucrada 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, sin embargo, isoformas como la ALDH3A1 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 cisteína reactiva no puede ser el blanco de inactivación de esta familia de enzimas.

El mecanismo por el cual los aldehídos lipídicos inactivan a la ALDH2 se puede explicar gracias a la formación de aductos con los residuos de cisteína expuestos en el sitio catalítico. La ALDH2 humana posee dos residuos de cisteína adyacentes a la cisteína catalítica. El cambio de estos residuos produjo enzimas mutantes que resistieron concentraciones de los aldehídos lipídicos 5-1000 veces más altas, comparadas con la enzima silvestre. Por otro lado, cuando un aldehído, reacciona con cualquier cisteína adyacente a la cisteína catalítica, forma un aducto el cual genera un impedimento estérico, que bloquea la entrada de otra molécula de aldehído para llevar a cabo la catálisis por la cisteína reactiva; así, entre más larga sea la cadena de carbonos en la molécula del aldehído, mayor será el impedimento estérico que se genere en el sitio de catálisis y, por tanto, aumentará el grado de inactivación, es decir, se requerirán concentraciones menores del aldehído insaturado para inactivar a la enzima (Figura 22). La mayor afinidad al incrementarse el largo de la cadena alifática, también puede deberse a que la molécula se puede estabilizar mejor en el embudo catalítico. Lo anterior se puede dilucidar gracias a las curvas de saturación de las enzimas con 2-hexenal y 2-

nonenal, ya que ambos aldehídos inactivan a la ALDH2 a concentraciones menores de  $0.5 \mu\text{M}$ , mientras que la acroleína inactiva a la enzima a concentraciones por arriba de  $5 \mu\text{M}$ .

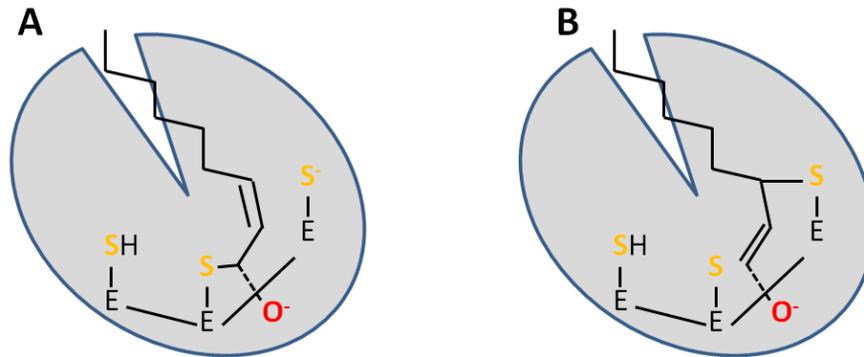


Figura 24. Unión del aldehído en el sitio catalítico. (A), reacción de la cisteína 302 con el C1 (carbonilo) del aldehído para llevar a cabo su oxidación; (B), formación del aducto de una cisteína adyacente a la 302 con la  $\alpha/\beta$  insaturación del aldehído.

En las mutantes H2C303V y H2C301T-C303V, también se puede observar que el valor de la constante de inactivación ( $K_i$ ), disminuye conforme se incrementa la longitud de la cadena de carbonos en los aldehídos insaturados, lo cual nos indica que estos compuestos tienen una mayor capacidad para inactivar a la enzima.

La actividad que presentó la doble mutante por acetaldehído disminuyó 2 veces, sin embargo, ésta no se vio afectada por el resto de aldehídos evaluados, incluidos los insaturados, a excepción del incremento en la velocidad por acroleína y los aldehídos de cadena larga (hexanal y nonenal). Por otro lado, ocurrió una disminución en la afinidad que la enzima presenta por diversos aldehídos, excepto por 4-HNE. La disminución en la afinidad se reflejó en la disminución de la eficiencia catalítica de entre 7 y 135 veces por los aldehídos saturados, mientras que ésta no se vio afectada por los aldehídos insaturados. Del mismo modo, H2C303V presentó una disminución en la afinidad por los aldehídos saturados. Es

importante resaltar que la afinidad que presenta una enzima por un determinado sustrato, depende de los residuos presentes en el sitio catalítico, ya que estos se encuentran involucrados en la unión del sustrato o directamente en la catálisis enzimática (González-Segura *et al.*, 2015; Muñoz-Clares *et al.*, 2015). Esto nos sugiere que la hidrofobicidad del sitio catalítico está cambiando con las mutaciones, lo cual se demuestra de forma indirecta con la reactividad de la cisteína 302 (catalítica), ya que en las mutantes la actividad de esterasa es alrededor de 3 y 7 veces menor para H2C301T-C303V y H2C303V, respectivamente, en comparación con la enzima silvestre. Por otro lado, la actividad que presentó la mutante sencilla H2C303V con los aldehídos saturados, fue aproximadamente 4 veces menor para la mayoría de los casos, comparada con la enzima silvestre. A este respecto, los resultados obtenidos de la desnaturalización por urea y por temperatura, nos sugieren que el cambio en la velocidad máxima de H2C303V no se debe a una modificación en la estabilidad estructural de la proteína. Además, el paso limitante para H2C303V no parece haberse modificado, ya que los resultados con magnesio nos sugieren que este siguió siendo la desacilación de la enzima y que este paso es menos limitante en la enzima mutante que en la enzima silvestre, por lo que esperaríamos que la velocidad de esta enzima fuera mayor y sin embargo, ésta es más baja que la de la enzima silvestre. Una propuesta para explicar la disminución en la actividad de H2C303V, podría ser que disminuyeron todas las constantes de velocidad en el mecanismo, de tal forma que a pesar de que el paso limitante sea un poco más rápido, la actividad se ve disminuida. Otra explicación sería que la mutación produjo un cambio estructural a distancia en el sitio de unión de la coenzima que rompió alguna interacción importante con el  $\text{NAD}^+$ , de tal forma que la unión de este sustrato sea más débil. Se ha reportado que ambos sitios tienen una comunicación importante durante la unión de los sustratos para poder llevar a cabo la catálisis (Perez-Miller *et al.*, 2009). Para probar si ocurrió algún cambio en el sitio de unión del  $\text{NAD}^+$  a consecuencia de las mutaciones, se podría determinar el valor de la  $K_d$  por  $\text{NAD}^+$  para las enzimas mutantes y la enzima silvestre. Un ejemplo de la comunicación entre estos sitios, es el de una variante de ALDH2 que

existe en la mitad de la población asiática, que consta de una mutación de un glutámico en la posición 487 por una lisina. Este cambio de aminoácido, hace que se rompan dos puentes de hidrógeno y con ellos, una hélice dentro de la estructura del sitio de unión del NAD<sup>+</sup>, lo cual ocasiona que la afinidad por este sustrato disminuya 10 veces (Perez-Miller *et al.* 2010). Sin embargo, se ha reportado que en presencia del activador ALDA-1, el cual se une en la entrada al sitio de unión del aldehído, dicha hélice se re-estructura y la afinidad por la coenzima se recupera, lo que nos demuestra que existe una comunicación importante entre ambos sitios de unión (Figura 23).

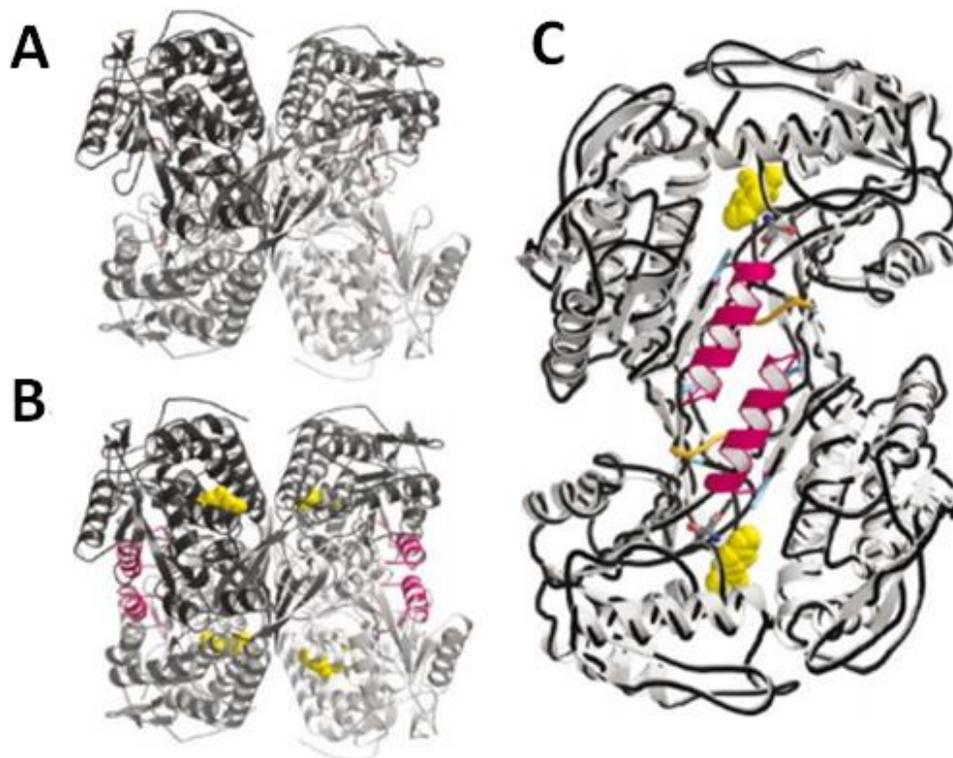


Figura 23. Diagrama de listón de la estructura cristalográfica de la variante asiática. (A), en ausencia del activador ALDA-1 (código PDB; 2ONM); (B), en presencia del activador ALDA-1 (código PDB; 3INL); (C), en rojo se muestra la reestructuración de la hélice en el dímero de la variante asiática en presencia del activador ALDA-1. (Perez-Miller *et al.* 2010).

La mutación de ambos residuos de cisteína adyacentes a la cisteína 302 (reactiva) en la mutante H2C301T-C303V, nos sugiere que se promovió el cambio del paso limitante de la enzima, pasando de la liberación del acilo a la liberación de la coenzima reducida (NADH). Sin embargo, cuando se realizó el cambio del residuo de cisteína 303 por valina en la mutante H2C303V, esto no ocurrió, lo que nos sugiere que se requiere del cambio del residuo 301 o del cambio en ambos residuos, para favorecer la modificación en dicho paso. El cambio en el paso limitante es importante porque de éste depende la velocidad con la que ocurre la reacción global y la modificación en la velocidad por ciertos moduladores (activadores), como el tamoxifen, el cual acelera la velocidad de liberación del NADH, pero no del acilo (Belmont-Díaz *et al.*, 2015) o el Alda-1, que modifica tanto la desacilación como la liberación de la coenzima reducida (Belmont-Díaz *et al.* Artículo enviado).

Los cambios puntuales de los aminoácidos en el sitio catalítico pueden afectar de diferente manera los parámetros cinéticos de cada isoforma de ALDH, explicando las diferencias que existen entre ellas, como la afinidad que presentan por los diferentes sustratos, así como en el paso limitante de la reacción. Como se mencionó en el capítulo 2 de la introducción, ALDH1A1 y ALDH2 son enzimas tetraméricas que comparten más del 70% de identidad en cuanto a la composición de aminoácidos en su secuencia (Steinmetz *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1998). ALDH2 presenta un par de cisteínas, adyacentes a la Cys302 reactiva en la posición 301 y 303, mientras que ALDH1A1 presenta un residuo de treonina y uno de valina en las posiciones equivalentes. En función de la polaridad, la treonina y la cisteína son similares, pero la valina es un aminoácido no polar a diferencia de la cisteína. Al comparar los parámetros cinéticos de H2C301T-C303V con los determinados para ALDH1A1, podemos apreciar que los valores son muy parecidos; ALDH1A1 presenta una cisteína en la posición 301 y una isoleucina en la posición 303, estos son aminoácidos con características similares a los que presenta H2C301T-C303V en las posiciones equivalentes (Thr301 y Val303),

debido a esta conservación de aminoácidos en el dominio catalítico se puede explicar que la mutante se comporte cinéticamente de forma similar a ALDH1A1.

A pesar de que se ha reportado que el 4-HNE es un compuesto altamente tóxico a concentraciones por arriba de 20  $\mu\text{M}$ , en bajas concentraciones ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) funciona como un segundo mensajero el cual es capaz de regular algunas funciones celulares; por ejemplo, estimula la quimiotaxis en fagocitos y la actividad de algunas enzimas y receptores, incluyendo la adenilato ciclasa, guanilato ciclasa, Fosfolipasa C y proteína cinasa C. Estos niveles de 4-HNE también pueden incrementar la síntesis de las proteínas de choque térmico (Hsp) y pueden activar la vía de Keap 1 (Modulador de Nrf2), lo cual incrementa la actividad de enzimas antioxidante (SOD, glutatión transferasas,  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa) (Sastre *et al.*, 2005; Ford, 2004; Thoma *et al.*, 2004). Debido a las múltiples funciones del 4-HNE, la concentración de este aldehído debe estar estrictamente regulada, una de las formas en las que la célula es capaz de sentir la concentración de este aldehído es mediante la inactivación de la ALDH2, lo cual permite que se acumule el 4-HNE para que se genere una respuesta ante el estrés oxidante. Por tal motivo, proponemos que los residuos de cisteína adyacentes a la C302 en ALDH2 han sido evolutivamente seleccionados para permitir dicha inactivación por los aldehídos lipídicos.

En el caso de las mutantes H2C303V y H2C301T-C303V la baja sensibilidad que presentan por los aldehídos lipídicos y la disminución en la afinidad por la coenzima (aproximadamente 5 veces, dato no mostrado), nos lleva a suponer que es por estos motivos que estas mutaciones no están presentes en la naturaleza.

## Conclusión

Los resultados obtenidos en esta tesis nos llevan a concluir que, los residuos de cisteína expuestos en el sitio catalítico de la enzima son blancos importantes en la formación de aductos con aldehídos, pues el cambio de estos residuos presentes en el sitio activo de la ALDH2 humana, produjo mutantes más resistentes a la inactivación por los aldehídos lipídicos, incluso a concentraciones 1000 veces mayores que las requeridas para inactivar a la enzima silvestre. Además, se determinó que estos residuos participan en definir el paso limitante de la reacción en las diferentes isoformas de este grupo de enzimas y adicionalmente, estos residuos son importantes para establecer la diferencia en especificidad por sustratos, que presentan las diversas isozimas. Por otro lado, si se compara la eficiencia catalítica de la enzima mutante H2C301T-C303V con la enzima ALDH3A1 (enzima resistente naturalmente a la inactivación por acroleína, 2-hexenal, 2-nonenal y 4-HNE), se puede observar que la mutante presenta una afinidad y una eficiencia catalítica 350 y 140 veces mayores, respectivamente, por los aldehídos lipídicos. Por lo que, esta enzima además de ser resistente a la inactivación por los productos de la peroxidación lipídica, tiene la ventaja de poseer una eficiencia catalítica mayor, en comparación con otras isoformas de ALDH resistentes a la inactivación por aldehídos producidos durante la peroxidación lipídica.

Finalmente, los resultados obtenidos de las curvas de crecimiento nos sugieren que la expresión de la enzima H2C301T-C303V podría ser utilizada en modelos celulares, para proteger del daño generado por estrés oxidante. Esta enzima podría emplearse con un fin biotecnológico para desintoxicar aldehídos contaminantes y/o tener especies resistentes a condiciones extremas de estrés en procesos como la bioremediación o industriales.

## **Perspectivas**

Se cumplió el objetivo de este trabajo al generar una enzima más resistente a los productos de la lipoperoxidación, cambiando las cisteínas adyacentes a la cisteína catalítica por los residuos presentes en la ALDH3A1 (enzima resistente a la inactivación). Sin embargo, aún falta optimizar estas mutaciones para mejorar la afinidad de la enzima resistente por la mayoría de los aldehídos, la cual se pierde y disminuye importantemente. Queda pendiente además evaluar la contribución del cambio en el residuo Cys301 por treonina tanto en la pérdida de afinidad, como en el cambio en el paso limitante de la reacción de la mutante doble. Lo anterior, debido a que los datos obtenidos en esta tesis sugieren que el cambio en este residuo podría ser responsable del cambio en el paso limitante de la reacción de la enzima durante el mecanismo cinético.

De manera adicional a la caracterización cinética y estructural, se pretende evaluar la protección celular que confiere la expresión de la enzima H2C301T-C303V ante el estrés oxidante en una línea celular eucarionte, como lo serían las levaduras, con el fin de proponer esta enzima para un fin biotecnológico o fisioterapéutico.

## Anexo I. Biología molecular

Tabla 8. Concentración de reactivos para obtener los fragmentos directos y reversos de las mutantes H2C303V y H2C301T-C303V por PCR

|   |        |
|---|--------|
| 10x amortiguador 10 mM Tris-HCl pH 8.3.....   | 1X     |
| dNTPs.....                                    | 0.2 mM |
| DNA molde (ALDH2).....                        | 100 ng |
| Cebador directo o reverso.....                | 200 ng |
| Oligonucleótido NNTH2/C-Ter.....              | 200 ng |
| DNA Polimerasa ( <i>Vent</i> polimerasa)..... | 2 U    |
| H <sub>2</sub> O estéril                      |        |

Tabla 9. Concentración de reactivos para obtener el gen de las mutantes H2C303V y H2C301T-C3303V por PCR

|   |        |
|---|--------|
| 10x amortiguador 10 mM Tris-HCl pH 8.3.....   | 1X     |
| dNTPs.....                                    | 0.2 mM |
| DNA fragmento directo.....                    | 100 ng |
| DNA fragmento reverso.....                    | 100 ng |
| Cebador NNTH2.....                            | 200 ng |
| Cebador UCT-pET.....                          | 200 ng |
| DNA Polimerasa ( <i>Vent</i> polimerasa)..... | 2 U    |
| H <sub>2</sub> O estéril                      |        |

Tabla 10. Diseño de los oligonucleótidos externos para la generación de las mutantes H2C303V y H2C301T-C303V.

| Cebador   | Secuencia de nucleótidos            |
|-----------|-------------------------------------|
| NNTH2     | 5'- GGG GTA CCG GTC ATA TGT CAG -3' |
| C-Ter     | 5'- AGC ATT GGT AAC TGT CAG ACC -3' |
| UCT-pET45 | 5'- CAA AAA ACC CCT CAA GAC CCA -3' |

Tabla 11. Condiciones para PCR

|           |                |            |                   |              |
|-----------|----------------|------------|-------------------|--------------|
| 1 ciclo   | 95 °C          | 5 minutos  |                   |              |
| 39 ciclos | 95 °C          | 1 minuto   | Desnaturalización |              |
|           | 44.2 – 62.2 °C | 1 minuto   |                   | Alineamiento |
|           | 72 °C          | 2 minutos  |                   | Extensión    |
| 1 ciclo   | 72 °C          | 10 minutos |                   |              |

Tabla 12. Concentración de reactivos para la reacción de ligación

|   |           |
|---|-----------|
| Amortiguador de reacción para la T4 DNA ligasa..... | 1X        |
| Producto de PCR purificado (Inserto).....           | 50-100 ng |
| Vector de sobreexpresión pET-45b.....               | 50-100 ng |
| T4 DNA ligasa.....                                  | 400 U     |

Incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Tabla 13. Concentración de reactivos para la reacción de restricción

|   |            |
|---|------------|
| Amortiguador de reacción.....                     | 1X         |
| DNA plasmídico.....                               | 50-100 ng  |
| Enzima de restricción (Hind III/Nco I/Sma I)..... | 20/10/20 U |

H<sub>2</sub>O estéril cbp 20 µL

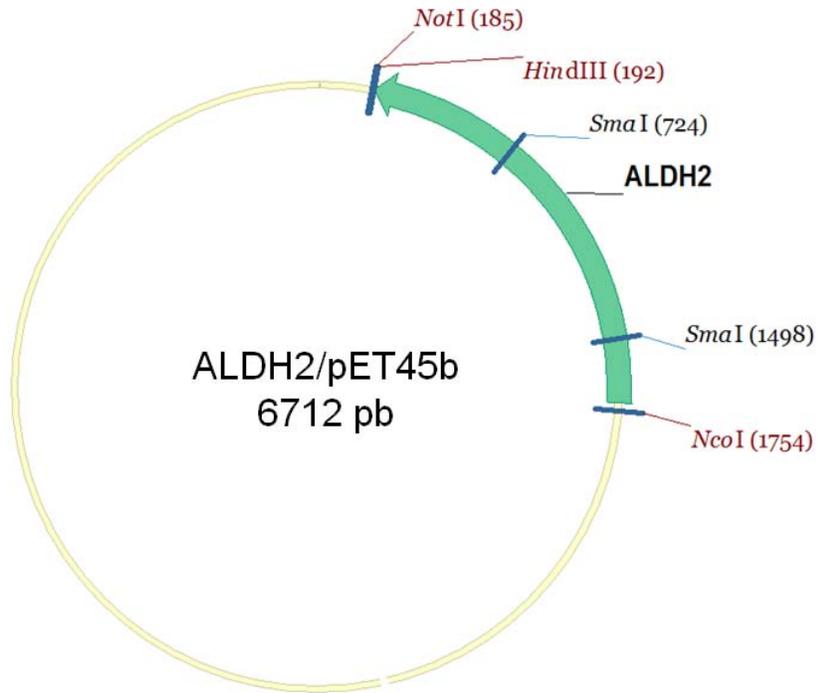


Figura 24. Construcción del plásmido con el vector de sobre-expresión pET45b y el gen de la enzima silvestre. Dentro del plásmido se muestran los sitios de restricción empleados para corroborar la identidad del gen de las enzimas mutantes H2C303V y H2C301T-C303V.

## **Referencias bibliográficas.**

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

Belmont-Díaz JA, Calleja-Castañeda LF, Yoval-Sánchez B, Rodríguez-Zavala JS. Tamoxifen, an anticancer drug, is an activator of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins*. 2015; 83(1):105-116.

Bennett AF, Buckley PD, Blackwell LF. Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions. *Biochemistry*. 1983; 22(4):776-784.

Bennett AF, Buckley PD, Blackwell LF. Proton release during the pre-steady-state oxidation of aldehydes by aldehyde dehydrogenase. Evidence for a rate-limiting conformational change. *Biochemistry*. 1982; 21(18):4407-4413.

Blackwell LF, Motion RL, MacGibbon AK, Hardman MJ, Buckley PD. Evidence that the slow conformation change controlling NADH release from the enzyme is rate-limiting during the oxidation of propionaldehyde by aldehyde dehydrogenase. *The Biochemical Journal*. 1987; 242(3):803-808.

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

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

Calleja-Castañeda LF. Identificación de los residuos implicados en la inactivación de las ALDHs humanas por los productos de la peroxidación lipídica. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM. 2015.

Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, Ickes BR, Petersen DR. Modification of heat shock protein 90 by 4-hydroxynonenal in a rat model of chronic alcoholic liver

disease. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2005; 315(1):8-15.

Chavez JD, Wu J, Bisson W, Maier CS. Site-specific proteomic analysis of lipoxidation adducts in cardiac mitochondria reveals chemical diversity of 2-alkenal adduction. Journal of Proteomics. 2011; 74(11):2417-2429.

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

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

Dickinson FM, Hart GJ. Effects of  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  on sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. The Biochemical Journal. 1982; 205(2):443-448.

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

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

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

Eisenthal R, Danson MJ, Hough DW. Catalytic efficiency and *k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>*: a useful comparator? Trends in Biotechnology. 2007; 25(6):247-249.

Esterbauer H, Wäg G, Puhl H. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. British Medical Bulletin. 1993; 49(3):566-5676.

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

Feldman RI, Weiner H. Horse liver aldehyde dehydrogenase. I. Purification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972; 247(1):260-266.

Feldman RI, Weiner H. Horse liver aldehyde dehydrogenase. II. Kinetics and mechanistic implications of the dehydrogenase and esterase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 1972; 247(1):267-272.

Ford WC. Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. *Human Reproduction Update*. 2004; 10(5):387-399.

Galter D, Buervenich S, Carmine A, Anvret M, Olson L. 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*. 2003; 14(3):637-647.

González-Segura L, Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Muñoz-Clares RA. Residues that influence coenzyme preference in the aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interaction*. 2015; 234:59-74.

Hempel J, Bühler R, Kaiser R, Holmquist B, de Zalenski C, von Wartburg JP, Vallee B, Jörnvall H. Human liver alcohol dehydrogenase. 1. The primary structure of the beta 1 beta 1 isoenzyme. *European Journal of Biochemistry*. 1984; 145(3):437-445.

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

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

Ho KK, Allali-Hassani A, Hurley TD, Weiner H. Differential effects of Mg<sup>2+</sup> ions on the individual kinetic steps of human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases. *Biochemistry*. 2005; 44(22):8022-8029.

Horton RM, Cai Z, Ho SM, Pease LR. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques*. 2013; 54(3):129-133.

Hsu LC, Chang WC, Yoshida A. Cloning of a cDNA encoding human ALDH7, a new member of the aldehyde dehydrogenase family. *Gene*. 1994; 151(12):285-289.

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

Kaneko T, Tahara S, Taguchi T, Kondo H. 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*. 2001; 487(12):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. Discovery of a novel class of covalent inhibitor for aldehyde dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011; 286(50):43486-43494.

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

Klyosov AA, Rashkovetsky LG, Tahir MK, Keung WM. Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism. *Biochemistry*. 1996; 35(14):4445-4456.

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

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

Larson HN, Zhou J, Chen Z, Stamler JS, Weiner H, Hurley TD. Structural and functional consequences of coenzyme binding to the inactive asian variant of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: roles of residues 475 and 487. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(17):12940-12950.

Lassen N, Bateman JB, Estey T, Kuszak JR, Nees DW, Piatigorsky J, Duester G, Day BJ, Huang J, Hines LM, Vasiliou V. 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*. 2007; 282(35):25668-25676.

Lassen N, Black WJ, Estey T, Vasiliou V. The role of corneal crystallins in the cellular defense mechanisms against oxidative stress. *Seminars in Cell Developmental Biology*. 2008; 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. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nature Structural Biology*. 1997; 4(4):317-326.

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

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

MacGibbon AK, Buckley PD, Blackwell LF. Evidence for two-step binding of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide to aldehyde dehydrogenase. *The Biochemical Journal*. 1977; 165(3):455-462.

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

Mann CJ, Weiner H. Differences in the roles of conserved glutamic acid residues in the active site of human class 3 and class 2 aldehyde dehydrogenases. *Protein Science*. 1999; 8(10):1922-9.

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

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

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

Muñoz-Clares RA, González-Segura L, Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A. Amino acid residues that affect the basicity of the catalytic glutamate of the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interaction*. 2015; 234:45-58.

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

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

Papazafiropoulou A, Skliros E, Sotiropoulos A, Papafragos C, Gikas A, Apostolou O, Kaliora H, Tountas C. 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*. 2011; 12:75.

Pappa A, Brown D, Koutalos Y, DeGregori J, White C, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase 3A1 inhibits proliferation and promotes survival of human corneal epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005; 280(30):27998-28006.

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

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

Perez-Miller S, Younus H, Vanam R, Chen CH, Mochly-Rosen D, Hurley TD. Alda-1 is an agonist and chemical chaperone for the common human aldehyde dehydrogenase 2 variant. *Nature Structural and Molecular Biology*. 2010; 17(2):159-164.

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

Rodriguez-Zavala J, Weiner H. Role of the C-terminal tail on the quaternary structure of aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*. 2001; 132(1-3):151-60.

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

Sastre J, Martín JA, Gómez-Cabrera MC, Pereda J, Borrás C, Pallardó FV, Viña J. Age-associated oxidative damage leads to absence of gamma-cystathionase in over 50% of rat lenses: relevance in cataractogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*. 2005; 38(5):575-582.

Segel IH. *Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems*. Willy Classics Library. 1993.

Steinmetz CG, Xie P, Weiner H, Hurley TD. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure*. 1997; 5(5):701-711.

Takahashi K, Weiner H. Magnesium stimulation of catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Changes in molecular weight and catalytic sites. *The Journal of Biological Chemistry*. 1980; 255(17):8206-8209.

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

Thoma I, Krischke M, Loeffler C, Mueller MJ. The isoprostanoid pathway in plants. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2004; 128(1-2):135-148.

Vallari RC, Pietruszko R. Interaction of Mg<sup>2+</sup> with human liver aldehyde dehydrogenase. I. Species difference in the mitochondrial isozyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 1984; 259(8):4922-4926.

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

Wang MF, Han CL, Yin SJ. Substrate specificity of human and yeast aldehyde dehydrogenases. *Chemico-Biological Interactions*. 2009; 178(1-3):36-39.

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

Weiner H, Hu JH, Sanny CG. Rate-limiting steps for the esterase and dehydrogenase reaction catalyzed by horse liver aldehyde dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1976; 251(13):3853-3855.

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

Yan J, De Melo J, Cutz JC, Aziz T. Aldehyde dehydrogenase 3A1 associates with prostate tumorigenesis. *British Journal of Cancer*. 2014; 110(10):2593-603.

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

Yoval-Sánchez B, Pardo JP, Rodríguez-Zavala JS. New insights into the half-of-the-sites reactivity of human aldehyde dehydrogenase 1A1. *Proteins*. 2013; 81(8):1330-1339.

Zhou J, Weiner H. The N-terminal portion of mature aldehyde dehydrogenase affects protein folding and assembly. *Protein Science*. 2001; 10(8):1490-7.