



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL FISIOLÓGICO Y BASES ESTRUCTURALES DE LA
ESPECIFICIDAD POR ALDEHÍDOS DE LA AMINO ALDEHÍDO
DESHIDROGENASA PauC DE *Pseudomonas aeruginosa*, UN
POTENCIAL BLANCO DE FÁRMACOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. YUDY VANESA CARDONA CARDONA

TUTORA PRINCIPAL

Dra. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Dr. JOSÉ IGNACIO REGLA CONTRERAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**PAPEL FISIOLÓGICO Y BASES ESTRUCTURALES DE LA
ESPECIFICIDAD POR ALDEHÍDOS DE LA AMINO ALDEHÍDO
DESHIDROGENASA PauC DE *Pseudomonas aeruginosa*, UN
POTENCIAL BLANCO DE FÁRMACOS**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. YUDY VANESA CARDONA CARDONA

TUTORA

Dra. ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad de México, marzo 2022.

JURADO

PRESIDENTE Dr. Miguel Antonio Costas Basín

VOCAL Dra. Adela Rodríguez Romero

VOCAL Dra. Gloria Soberón Chávez

VOCAL Dra. Emma Saavedra

SECRETARIO Dra. Nuria Victoria Sánchez Puig

SUSTENTANTE

M. en C. Yudy Vanesa Cardona Cardona

TUTORA

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares

Comité Tutor

Dra. Adela Rodríguez Romero

Dr. José Ignacio Regla Contreras

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), a la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por la formación académica brindada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de posgrado otorgada bajo el número de becario 583716.

A la Facultad de Química, UNAM, por el apoyo económico otorgado a través de la beca UNAM-DGAPA-PAPIIT IN220317

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de las becas 283524 y 252123.

Al proyecto de supercómputo: LANCAD-UNAM-DGTIC-215, 2021.

A la Dra. Rosario Muñoz Clares, por permitirme hacer parte de su grupo de investigación, por su apoyo y sus enseñanzas durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero y al Dr. José Ignacio Regla por los comentarios y la guía en este trabajo de investigación como miembros del Comité Tutor.

A los miembros del jurado, por las observaciones y sugerencias para mejorar la versión final del documento.

Al Dr. José Ignacio Regla por su ayuda con la síntesis de aldehídos.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por su ayuda con los estudios de acoplamiento molecular.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz por su ayuda con la obtención de los genes mutantes y los experimentos de RT-qPCR.

Al Biól. Carlos Mújica Jiménez, por su apoyo y asesoría técnica en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
I. ANTECEDENTES	6
I.1. Generalidades de <i>P. aeruginosa</i>	6
I.2. Poliaminas en los sitios de infección de <i>P. aeruginosa</i>	7
I.3. Funciones fisiológicas de la enzima <i>PaPauC</i>	8
I.4. Contexto genómico de <i>PaPauC</i>	10
I.5. Inducción del gen <i>PapauC</i>	12
I.6. Reactividad y toxicidad de los aldehídos.....	12
I.7. Mecanismo químico de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs)	13
I.8. Mecanismo cinético de las ALDH.....	14
I.9. Estructura tridimensional de <i>PaPauC</i>	17
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS	23
IV.1. Objetivo general.....	23
IV.2. Objetivos específicos.....	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS	24
V.1. Compuestos químicos.....	24
V.2. Síntesis química de aldehídos.....	24

V.2.1. Síntesis del 4-glutamilaminobutiraldehído dietil acetal.....	25
V.2.2. Síntesis del 3-glutamilaminopropioaldehído dietil acetal.....	27
V.2.3. Síntesis del cloruro de 4-trimetilaminobutiraldehído dietil acetal.....	27
V.2.4. Síntesis del cloruro de 4-guanidinobutiraldehído dietil acetal.....	28
V.3. Expresión y purificación de la enzima recombinante <i>PaPauC</i>	30
V.4. Mutagénesis sitio dirigida.....	31
V.5. Ensayo de actividad de la <i>PaPauC</i> recombinante.....	33
V.6. Determinación de los parámetros cinéticos de la <i>PaPauC</i> recombinante con diferentes aldehídos.....	33
V.7. Caracterización fisicoquímica de <i>PaPauC</i>	34
V.8. Validación de la cepa mutante <i>pauC::ISlacZ</i> de <i>P. aeruginosa</i>	34
V.9. Crecimientos de las cepas silvestre y mutante <i>pauC::ISlacZ</i> de <i>P. aeruginosa</i> e inhibición del crecimiento bacteriano.....	35
V.10. Determinación de actividad ALDH en extractos crudos.....	36
V.11. Determinación de los niveles de expresión del gen <i>PapauC</i>	36
V.12. Acoplamiento molecular de diferentes aldehídos en el sitio activo de <i>PaPauC</i> ...37	
V.12.1. Cálculos mecano-cuánticos de los ligandos y simulaciones de acoplamiento molecular.....	38
VI. RESULTADOS: Capítulo I. Importancia de la enzima <i>PaPauC</i> en el catabolismo y toxicidad de las poliaminas en <i>P. aeruginosa</i>.....	39
VI.1. La enzima recombinante <i>PaPauC</i> oxida a APAL, GluAPAL, ABAL y GluABAL con diferente eficiencia.....	39

VI.2. Confirmación de que la actividad de <i>PaPauC</i> es crítica para el crecimiento de células de <i>P. aeruginosa</i> en poliaminas.....	42
VI.3. La actividad de <i>PaPauC</i> y la expresión del gen <i>PapauC</i> aumentan en células de <i>P. aeruginosa</i> crecidas en poliaminas.....	48
VI.4. La toxicidad de Spm, Spd o Dap se correlaciona con los niveles de actividad de <i>PaPauC</i>	51
VI.5. APAL, pero no GluAPAL, es altamente tóxico para las células de <i>P. aeruginosa</i>	55
VII. DISCUSIÓN: Capítulo I. Importancia de la enzima <i>PaPauC</i> en el catabolismo y toxicidad de las poliaminas en <i>P. aeruginosa</i>	61
VII.1. La formación de APAL es en gran parte responsable de la toxicidad de Spm, Spd y Dap para las células de <i>P. aeruginosa</i>	61
VII.2. <i>PaPauC</i> es un nuevo potencial blanco terapéutico contra la infección por <i>P. aeruginosa</i>	63
VIII. RESULTADOS: Capítulo II. Investigación de los residuos de aminoácidos importantes para la especificidad por el aldehído de <i>PaPauC</i>	68
VIII.1. Especificidad de <i>PaPauC</i> por diferentes sustratos aldehídos.....	68
VIII.2. Descripción del sitio activo de <i>PaPauC</i>	74
VIII.3. El acoplamiento molecular de los sustratos aldehídos en el sitio activo de la enzima <i>PaPauC</i> mostró residuos de aminoácidos posiblemente involucrados en su unión.....	78

VIII.4. Mutagénesis sitio-dirigida de los residuos sugeridos por los acoplamientos moleculares como importantes en la unión de los sustratos aldehídos.....	82
<i>VIII.4.1. Estado oligomérico de la enzima PaPauC silvestre y sus variantes.....</i>	<i>82</i>
<i>VIII.4.2. Estabilidad térmica de la PaPauC silvestre y sus variantes.....</i>	<i>84</i>
VIII.5. Cinética de saturación de las variantes de PaPauC con los diferentes aldehídos fisiológicos de esta enzima.....	86
<i>VIII.5.1. Saturación por PAL de las variantes de PaPauC.....</i>	<i>86</i>
<i>VIII.5.2. Saturación por APAL de las variantes de PaPauC.....</i>	<i>94</i>
<i>VIII.5.3. Saturación por GluAPAL de las variantes de PaPauC.....</i>	<i>100</i>
<i>VIII.5.4. Saturación por ABAL de las variantes de PaPauC.....</i>	<i>106</i>
<i>VIII.5.5. Saturación por GluABAL de las variantes de PaPauC.....</i>	<i>111</i>
<i>VIII.5.6. Saturación por GdBAL de las variantes de PaPauC.....</i>	<i>117</i>
<i>VIII.5.7. Saturación por TMABAL de las variantes de PaPauC.....</i>	<i>122</i>
IX. DISCUSIÓN: Capítulo II. Residuos de aminoácidos importantes para la especificidad por el aldehído de PaPauC.....	127
IX.1. La caracterización cinética de la enzima mostró la eficiencia catalítica de PaPauC con cada uno de los sustratos fisiológicos.....	127
IX.2. La estructura tridimensional de PaPauC explica la especificidad por sus sustratos encontrada en los estudios cinéticos.....	128
IX.3. El acoplamiento molecular es una herramienta guía que se debe complementar con estudios experimentales.....	131

IX.4. La mutagénesis sitio-dirigida confirmó los residuos importantes para la especificidad de <i>PaPauC</i> por cada aldehído.....	132
IX.5. Las características estructurales del sitio activo de <i>PaPauC</i> podrían usarse para desarrollar un inhibidor específico de esta enzima.....	135
X. CONCLUSIONES	137
XI. PERSPECTIVAS	138
XII. BIBLIOGRAFÍA	139
APÉNDICES	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Producción de aminoaldehídos a partir de poliaminas y aminoácidos en <i>P. aeruginosa</i>	9
Fig. 2. Genes vecinos del gen <i>PapauC</i>	10
Fig. 3. Mecanismo químico de la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas.....	14
Fig. 4. Mecanismo cinético Bi Bi Ordenado en estado estacionario propuesto para las ALDHs.....	15
Fig. 5. Mecanismo de inhibición propuesto para las enzimas ALDHs a altas concentraciones de aldehído.....	17
Fig. 6. Síntesis de aldehídos.....	29
Fig. 7. Cinética de saturación de la enzima <i>PaPauC</i> recombinante con ω -aminoaldehídos y glutamil- ω -aminoaldehídos.....	40
Fig. 8. Confirmación de la inserción del transposón <i>ISlacZ/hah</i> en la cepa mutante <i>pauC::ISlacZ</i>	44
Fig. 9. Crecimiento de células de <i>P. aeruginosa</i> en poliaminas.....	47
Fig. 10. Actividad específica de <i>PaPauC</i> en extractos crudos de las células silvestres de <i>P. aeruginosa</i> cultivadas en poliaminas en ausencia o presencia de glucosa.....	48
Fig. 11. Expresión del gen <i>PapauC</i> en células de <i>P. aeruginosa</i> cultivadas en poliaminas en ausencia o presencia de glucosa.....	51
Fig. 12. Efectos de Spm y Spd sobre el crecimiento de células silvestres de <i>P. aeruginosa</i> y de la mutante <i>pauC::ISlacZ</i>	53
Fig. 13. Crecimiento de células de <i>P. aeruginosa</i> en ω -aminoaldehídos libres y glutamilados y efectos de estos aldehídos sobre el crecimiento en glucosa.....	55
Fig. 14. Cinética de saturación de la enzima <i>PaPauC</i> por diferentes aldehídos.....	70
Fig. 15. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima <i>PaPauC</i> con diferentes aldehídos y diferentes ajustes.....	71
Fig. 16. Sitio activo de la enzima <i>PaPauC</i>	75
Fig. 17. Acoplamiento molecular de aldehídos en el sitio activo de <i>PaPauC</i>	79

Fig. 18. Purificación de <i>PaPauC</i> silvestre y estado oligomérico de <i>PaPauC</i> silvestre y variantes.....	83
Fig. 19. Estabilidad térmica de la enzima <i>PaPauC</i> y sus variantes.....	84
Fig. 20. Curvas de saturación con PAL de las diferentes variantes de <i>PaPauC</i>	87
Fig. 21. Comparación de los sitios activos de la enzima <i>PaPauC</i> con las enzimas ALDH2 y ALDH1A2 de humano.....	91
Fig. 22. Curvas de saturación con APAL de las diferentes variantes de <i>PaPauC</i>	95
Fig. 23. Curvas de saturación con GluAPAL de las diferentes variantes de <i>PaPauC</i>	101
Fig. 24. Curvas de saturación con ABAL de las diferentes variantes de <i>PaPauC</i>	107
Fig. 25. Curvas de saturación con GluABAL de las diferentes variantes de <i>PaPauC</i>	112
Fig. 26. Curvas de saturación con GdBAL de las diferentes variantes de <i>PaPauC</i>	118
Fig. 27. Curvas de saturación con TMABAL de las diferentes variantes de <i>PaPauC</i>	123
Fig. 28. Comparación de los sitios activos de la enzima <i>PaPauC</i> con enzimas con actividad AMADH y las ALDHs de humano.....	129
Fig. 29. Comparación de los parámetros cinéticos de las enzimas variantes respecto a los de <i>PaPauC</i> con diferentes aldehídos.....	133
Fig. 30. Comparación estructural de los sitios activos de <i>PaPauC</i> y ALDH9A1.....	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para generar cada una de las mutantes analizadas en este trabajo.....	32
Tabla 2. Parámetros cinéticos de <i>PaPauC</i> usando ω -aminoaldehídos libres y glutamilados como sustratos variables.....	41
Tabla 3. Efecto de las poliaminas sobre la actividad de <i>PaPauC</i> medida en extractos crudos de células de <i>P. aeruginosa</i> crecidas en poliaminas o en poliaminas más glucosa y NH_4Cl	46
Tabla 4. Parámetros cinéticos de la enzima silvestre <i>PaPauC</i> con diferentes aldehídos como sustratos.....	72
Tabla 5. Valores estimados de T_m de la enzima <i>PaPauC</i> y sus variantes.....	85
Tabla 6. Parámetros cinéticos de las enzimas <i>PaPauC</i> silvestre y variantes usando PAL como sustrato.....	89
Tabla 7. Parámetros cinéticos de las enzimas <i>PaPauC</i> silvestre y variantes usando APAL como sustrato.....	97
Tabla 8. Parámetros cinéticos de las enzimas <i>PaPauC</i> silvestre y variantes usando GluAPAL como sustrato.....	103
Tabla 9. Parámetros cinéticos de las enzimas <i>PaPauC</i> silvestre y variantes usando ABAL como sustrato.....	109
Tabla 10. Parámetros cinéticos de las enzimas <i>PaPauC</i> silvestre y variantes usando GluABAL como sustrato.....	114
Tabla 11. Parámetros cinéticos de las enzimas <i>PaPauC</i> silvestre y variantes usando GdBAL como sustrato.....	120
Tabla 12. Parámetros cinéticos de las enzimas <i>PaPauC</i> silvestre y variantes usando TMABAL como sustrato.....	125

ABREVIATURAS

ABAL	4-Aminobutiraldehído
Agm	Agmatina
ALDH	Aldehído deshidrogenasas
AMADH	Aminoaldehído deshidrogenasa
APAL	3-Aminopropionaldehído
APTAL	5-Aminopentaldehído
Arg	Arginina
β-Ala	β -Alanina
Cad	Cadaverina
Dap	Diaminopropano
GABA	γ -Aminobutirato
GdBAL	4-Guanidinobutiraldehído
GluAPAL	3-Glutamilaminopropionaldehído
GluABAL	4-Glutamilaminobutiraldehído
GluAPTAL	5-Glutamilaminopentaldehído
Glu-β-ALA	Glutamil- β -alanina
Gluc	Glucosa
GluDap	Glutamildiaminopropano
GluGABA	Glutamil- γ -aminobutirato
GluSpd	Glutamilespermidina
GluSpm	Glutamilespermina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranósido
LB	Medio Luria Bertani
Lys	L-Lisina
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada)

NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida)
Orn	Ornitina
PaBADH	Betaína aldehído deshidrogenasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PapauC	Gen PA5312 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PaPauC	Aminoaldehído deshidrogenasa codificada por el gen PA5312 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAL	Propionaldehído
pET28b(+)-PapauC	Vector de expresión conteniendo el gen PA5312 (<i>PapauC</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
Put	Putrescina
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SEC	Cromatografía de exclusión molecular
Spd	Espermidina
Spm	Espermina
TMABAL	4-Trimetilaminobutiraldehído

RESUMEN

El patógeno oportunista humano *Pseudomonas aeruginosa* posee gran resistencia a los antibióticos, por lo que se necesitan urgentemente nuevos agentes terapéuticos. La cepa PAO1 de esta bacteria posee 23 aldehído deshidrogenasas de las cuales la enzima *PaPauC* es la única aminoaldehído deshidrogenasa involucrada en las rutas de degradación de las poliaminas de esta bacteria. Dado que los niveles de poliaminas se incrementan en los tejidos infectados por la bacteria, exploramos si la inhibición de la actividad de *PaPauC* puede aprovecharse para combatir la infección, dado que esta inhibición causaría la acumulación de un aldehído tóxico sustrato de esta enzima formado en la degradación de las poliaminas. Encontramos que esta enzima oxida el 3-aminopropionaldehído (APAL) y el 3-glutamilaminopropionaldehído (GluAPAL) producidos en la degradación de espermina (Spm), espermidina (Spd) y diaminopropano (Dap), así como el 4-aminobutiraldehído (ABAL) y el 4-glutamilaminobutiraldehído (GluABAL) formados en la degradación de putrescina (Put). Como la eficiencia catalítica de *PaPauC* con APAL fue 30 veces menor que con GluAPAL y este se forma predominantemente sobre APAL, este último aldehído se oxidará pobremente *in vivo*. Consistente con esto, Spm, Spd o Dap, pero no Put, fueron tóxicos para *P. aeruginosa* incluso en presencia de otras fuentes de carbono y nitrógeno, particularmente para una cepa carente de la actividad *PaPauC* por tener el gen *PapauC* interrumpido. APAL, pero no GluAPAL, fue altamente tóxico para *P. aeruginosa*, incluso para las células de tipo silvestre, lo que sugiere que su acumulación, particularmente en ausencia o baja actividad de *PaPauC*, es responsable de la toxicidad de Spm, Spd y Dap. Nuestros resultados arrojaron luz sobre el mecanismo de toxicidad de estas tres poliaminas y respaldan firmemente el papel crítico de *PaPauC* en esta toxicidad. Por lo tanto, *PaPauC*

emerge como un novedoso potencial blanco farmacológico cuya inhibición podría ayudar a combatir la infección por este importante patógeno.

Con el fin de sentar las bases moleculares para futuros esfuerzos en el diseño o selección de inhibidores específicos de esta enzima, estudiamos los determinantes estructurales de su especificidad por los diferentes aldehídos. Usando la estructura tridimensional de la enzima, simulaciones de acoplamiento molecular, mutagénesis sitio-dirigida y estudios cinéticos de las enzimas variantes obtenidas, investigamos los residuos del sitio activo involucrados en la unión de los aldehídos. Encontramos que tres residuos aromáticos del sitio activo—F169, W176 y F467—hacen interacciones catión- π con los grupos amino, amida o guanidino de los diferentes sustratos aldehídos. Su sustitución por una alanina provocó disminuciones importantes en los valores k_{cat} y k_{cat}/K_m y aumentos significativos en los de K_m con respecto a la enzima silvestre. La variante F169A mostró cambios muy drásticos en su cinética de saturación por todos los aldehídos, incluso con propionaldehído que carece de un grupo amino, lo que sugiere que F169 juega un papel importante en la unión y/o catálisis de todos ellos. También se observaron cambios muy importantes en los parámetros cinéticos de la variante K479A con todos los aldehídos, lo que sugiere que la pérdida de la cadena lateral de esta lisina produce cierto grado de desorganización del sitio activo. Los parámetros cinéticos estimados con GluAPAL y GluABAL fueron los más afectados en la variante K479, indicando que además este residuo es importante para la unión de ambos aldehídos. También encontramos que T303 y D459 son importantes para la unión de los aminoaldehídos de cadena más corta—ABAL y APAL—, pero también para la unión de GdBAL. En conjunto, los resultados de nuestros estudios sobre las relaciones estructura-función de PaPauC permitieron conocer las características estructurales del sitio activo de esta enzima requeridas para que se dé la unión catalíticamente

competente de los diferentes sustratos, así como explicar sus diferentes eficiencias catalíticas. Creemos que este conocimiento ayudará a encontrar o diseñar compuestos que inhiban específicamente a *PaPauC*.

ABSTRACT

The human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is highly resistant to antibiotics, thus new therapeutic agents are urgently needed. Of the 23 aldehyde dehydrogenases (ALDHs) in the *P. aeruginosa* PAO1 strain the *PaPauC* enzyme is the only aminoaldehyde dehydrogenase involved in the polyamine degradation pathways. Since polyamine levels are increased in infected tissues, we explored whether inhibition of *PaPauC* activity can be exploited in combating infection, given that this inhibition could cause the build-up of a toxic aldehyde substrate of this enzyme formed in polyamine degradation. We found that *PaPauC* oxidizes 3-aminopropionaldehyde (APAL) and 3-glutamylaminopropionaldehyde (GluAPAL) produced in spermine (Spm), spermidine (Spd) and diaminopropane (Dap) degradation, as well as 4-aminobutyraldehyde (ABAL) and 4-glutamylaminobutyraldehyde (GluABAL) formed in putrescine (Put) degradation. As the catalytic efficiency of *PaPauC* with APAL was 30-fold lower than with GluAPAL, and GluAPAL is predominantly formed over APAL, the latter aldehyde will be poorly oxidized *in vivo*. Consistent with this, Spm, Spd or Dap, but not Put, were toxic to *P. aeruginosa* even in the presence of other carbon and nitrogen sources, particularly to a strain lacking *PaPauC* activity because of disruption of the *PapauC* gene. APAL, but not GluAPAL, was highly toxic to *P. aeruginosa*, even to wild-type cells, suggesting that its accumulation—particularly in the absence or low activity of *PaPauC*—is responsible for Spm, Spd, and Dap toxicity. Our results shed light on the toxicity mechanism of these three polyamines and strongly support the critical role of *PaPauC* in this toxicity. Therefore, *PaPauC* emerges as a novel potential pharmacological target whose inhibition could help fight infection by this important pathogen.

In order to lay the molecular foundations for future efforts in the design or selection of specific inhibitors of this enzyme, we studied the structural determinants of its specificity for different aldehydes. Using the three-dimensional structure of the enzyme, molecular docking simulations, site-directed mutagenesis, and kinetic studies of the obtained variant enzymes, we investigated the active site residues involved in aldehyde binding. We found that three aromatic residues in the active site—F169, W176 and F467—make cation- π interactions with the amino, amide or guanidino groups of the different aldehyde substrates. Its replacement by an alanine caused significant decreases in the k_{cat} and $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ values and significant increases in the K_{m} values with respect to the wild-type enzyme. The F169A variant showed very drastic changes in its saturation kinetics for all aldehydes—even with propionaldehyde that lacks an amino group—, suggesting that F169 plays an important role in the binding and/or catalysis of all of the aldehydes. Very important changes were also observed in the K479A variant of most of the aldehydes tested, suggesting that the loss of the K497 sidechain produces some degree of disorganization of the active site. The estimated kinetic parameters of GluAPAL and GluABAL were the most affected, indicating that this residue is also important for the union of both aldehydes. We also found that T303 and D459 are important for the binding of the short-chain amino aldehydes ABAL and APAL and also for GdBAL binding. Together, the results of our studies on the *PaPauC* structure-function relationships contributed to the knowledge of the structural features of its active site needed for a catalytically competent binding of its different aldehyde substrates. We think that this, knowledge will aid in finding or designing compounds that specifically inhibit *PaPauC*.

I. ANTECEDENTES

I.1. Generalidades de *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria gram-negativa cuyo genoma consiste en un único cromosoma circular con un tamaño entre 5.5 - 7 Mb. El genoma de esta bacteria contiene un gran número de genes que codifican enzimas para diversas vías metabólicas, lo que le confiere una alta versatilidad nutricional. Además, alrededor del 8% de su genoma codifica para genes reguladores, lo que permite a la bacteria adaptarse a ambientes de crecimiento complejos y muy diversos (Wu *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* es un microorganismo ubicuo que produce enfermedades en plantas y animales, ya que codifica numerosos factores de virulencia, así como sistemas de secreción de toxinas y exoenzimas que contribuyen a la virulencia de la bacteria permitiéndole establecer diversas infecciones. Además, ha desarrollado una red reguladora complicada para controlar la expresión temporal de los factores de virulencia apropiados para obtener el beneficio de su entorno para la supervivencia bacteriana (Wu *et al.*, 2015). En humanos, *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que causa serias infecciones urinarias, de córnea, piel o pulmón, particularmente en enfermos de fibrosis quística a los que puede llevar a la muerte, y es una causa importante de morbilidad en pacientes con quemaduras graves o inmunodeprimidos como aquellos con SIDA o de cáncer bajo quimioterapia (Streeter y Katouli, 2016). El tratamiento de estas infecciones es muy difícil porque *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a varios antibióticos debido a la baja permeabilidad de su membrana externa, la expresión constitutiva de varias bombas de expulsión de fármacos y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos (por ejemplo, cefalosporinas) (Sanders y Sanders, 1986). Además, tiene una

notable capacidad para desarrollar o adquirir nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos. Estos mecanismos a menudo están presentes en la bacteria al mismo tiempo, confiriéndole múltiples formas de resistencia (revisado en Mesaros *et al.*, 2007, y en Savoia, 2014). Por todo esto, ha sido considerada por la organización mundial de la salud como una de las tres bacterias patógenas más peligrosas (Tacconelli *et al.*, 2018) y se están buscando activamente nuevas estrategias para combatir su infección.

I.2. Poliaminas en los sitios de infección de *Pseudomonas aeruginosa*

Las poliaminas putrescina (Put), cadaverina (Cad), espermina (Spm), espermidina (Spd) y diaminopropano (Dap) son importantes compuestos policatiónicos presentes en todos los organismos vivos (Tabor y Tabor, 1985). Están implicados en una gran e importante variedad de funciones fisiológicas como la síntesis de DNA, RNA y proteínas (revisado en Jastrzab *et al.*, 2017). Además, las poliaminas ayudan a las bacterias a contrarrestar el estrés oxidativo (Tarique *et al.*, 2017), condición imperante en los sitios de infección de *P. aeruginosa* (Kilbourn, 1978), al reaccionar con las especies reactivas de oxígeno producidas como mecanismo de defensa por los macrófagos del organismo infectado (Galli y Saleh, 2021). De acuerdo al estudio transcriptómico realizado por Mike *et al.*, 2007, los genes que codifican proteínas transportadoras de poliaminas como Put y Spd se inducen cuando la bacteria infecta los pulmones de pacientes con fibrosis quística, lo que sugiere que estos pacientes tienen niveles incrementados de poliaminas. Esto es consistente con otros estudios que indican que las poliaminas están presentes en tejidos infectados por *P. aeruginosa* (Teti *et al.*, 2002; Ibarra *et al.*, 2015; Maráková *et al.*, 2020) y con los hallazgos de niveles aumentados de Spm y Spd en fluidos fisiológicos como sangre y orina de pacientes con

fibrosis quística (Cohen *et al*, 1976; Rennert *et al*, 1976; Russell *et al*, 1979) o pacientes con cáncer (Bachrach, 2012; Nowotarski *et al*, 2013), que se sabe que son muy susceptibles a las infecciones por *P. aeruginosa* cuando reciben quimioterapia (Streeter y Katouli, 2016). Además, Grasmann *et al.* (2012) reportaron un aumento de las concentraciones de Spm en el esputo de pacientes con fibrosis quística.

I.3. Funciones fisiológicas de la enzima PaPauC

En *P. aeruginosa*, las vías de degradación de las poliaminas se han propuesto mediante análisis transcriptómicos y los fenotipos de crecimiento de cepas de *P. aeruginosa* en las que los genes involucrados se han interrumpido por inserción de transposones (Lu *et al*, 2002; Dasu *et al*, 2006; Chou *et al*, 2008; Yao *et al*, 2011; Chou *et al*, 2013). Las poliaminas pueden degradarse en su forma libre (Lu *et al*, 2002; Dasu *et al*, 2006; Chou *et al*, 2008) o pueden glutamilarse previamente en una reacción catalizada por la glutamilpoliamina sintetasa y luego entrar a la vía que usa los aminoaldehídos glutamilados, que se ha propuesto es la única operante (Yao *et al*, 2011; Chou *et al*, 2013). En cualquiera de estas dos vías degradativas, la aldehído deshidrogenasa (ALDH) PaPauC—anteriormente llamada KauB, ya que se había identificado como esencial para la degradación de cetoarginina (*ketoarginine utilization*) por esta bacteria (Jann *et al.*, 1988)—puede ser la única aminoaldehído deshidrogenasa (AMADH) que oxida los ω -aminoaldehídos 3-aminopropionaldehído (APAL) y 4-aminobutiraldehído (ABAL), o sus derivados glutamilados, el 3-glutamilaminopropionaldehído (GluAPAL) y el 4-glutamilaminobutiraldehído (GluABAL), formados como intermediarios en la degradación

de poliaminas (Fig. 1A), pero esto no se había probado experimentalmente en ensayos de actividad cuando se empezó la investigación que ahora reportamos.

PaPauC también participa oxidando el primer aldehído formado en tres de las cuatro rutas de degradación de la arginina (*Arg*) en *P. aeruginosa*: la que produce agmatina (*Agm*) y a partir de ella *Put* (Haas *et al*, 1984), la que forma 2-cetoarginina y a partir de este compuesto 4-guanidinobutiraldehído (*GdBAL*) como intermediario (Jann *et al*, 1988) y en la que se forma ornitina (*Orn*) y de esta *Put* (Haas *et al.*, 1979; Stalon *et al.* 1987; Nakada e Itoh, 2003). Además, *PaPauC* participa en una de las rutas de degradación de la lisina (*Lys*), la que produce cadaverina (*Cad*) (Fothergill y Guest, 1977; Indurthi *et al*, 2016). Tanto las poliaminas como estos aminoácidos son usados por la bacteria como fuente de carbono y de nitrógeno y sus esqueletos carbonados se incorporan al ciclo de Krebs.

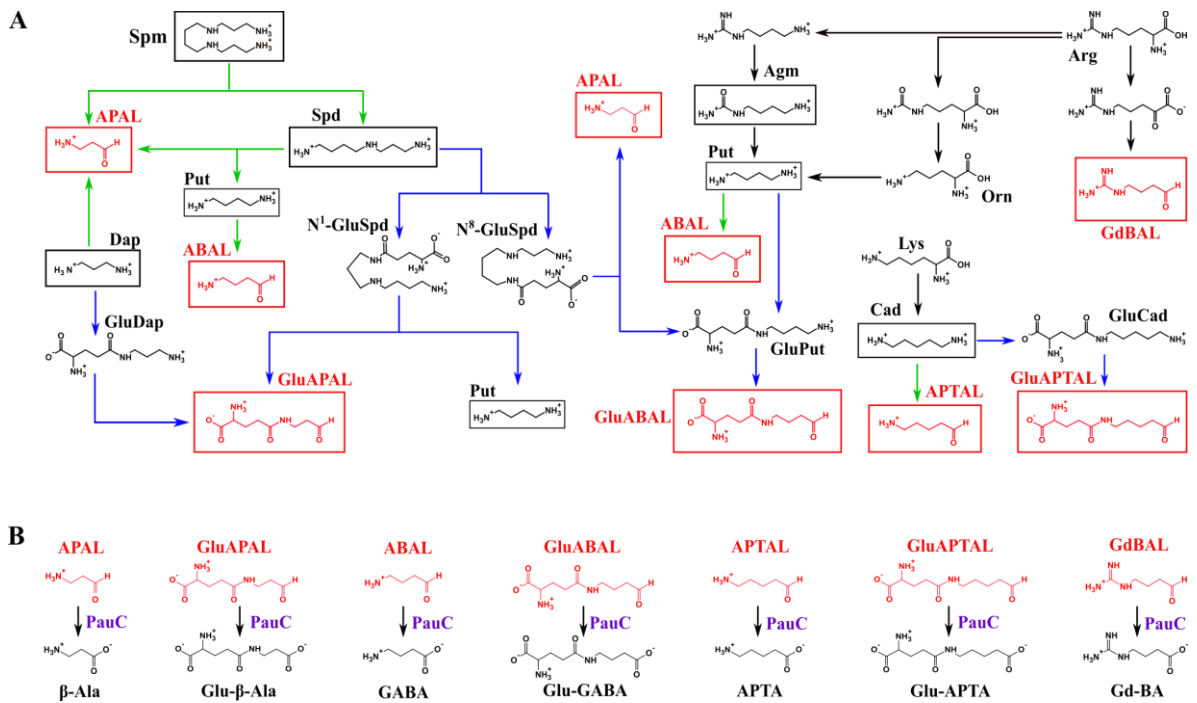


Fig. 1. Producción de aminoaldehídos a partir de poliaminas y aminoácidos en *P. aeruginosa*. (A) Rutas propuestas para Spm, Spd, Dap, Put, Cad, Arg y Lys. (B) Oxidación por *PaPauC* de los ω -aminoaldehídos y glutamil- ω -aminoaldehídos formando ω -aminoácidos de tres, cuatro o cinco carbonos: β -alanina (β -Ala), 4-aminobutirato (GABA), 5-aminopentanoato (APTA) y 4-guanidinobutirato (GdBA), los cuales formarán acetyl-CoA y succinato en reacciones posteriores en las rutas. Las poliaminas están encerradas en recuadros negros y los ω -aminoaldehídos en recuadros rojos. Las líneas verdes indican la ruta de degradación de poliaminas libres y las líneas azules indican las de degradación de poliaminas glutamiladas. El prefijo Glu indica las formas glutamiladas.

I.4. Contexto genómico de *PaPauC*

El producto del gen PA5312 (*PapauC*) pertenece a la familia ALDH27, que es exclusiva de bacterias (Riveros-Rosas *et al.*, 2013). A diferencia de *E. coli* donde el gen ortólogo de *PapauC* (llamado *pauC*) pertenece a un operón (*pau*) que incluye diversos genes involucrados en la utilización de Put (Kurihara *et al.*, 2005), en ninguna de las cepas de *P. aeruginosa* de genoma conocido *PapauC* forma parte de un operón (H. Riveros-Rosas, comunicación personal). Tiene dos genes vecinos, pero no contiguos, que también participan en el catabolismo de las poliaminas: PA5309 (llamado *pauB4*) en la región 5' que codifica una oxidorreductasa dependiente de FAD que cataliza la formación de Put o Glu-Put a partir de Spd (Chou *et al.*, 2013) y PA5313 en la región 3' que codifica la transaminasa que convierte GABA en semialdehído succínico y que también está involucrado en el catabolismo de Spd (Chou *et al.*, 2008) (Fig. 2).

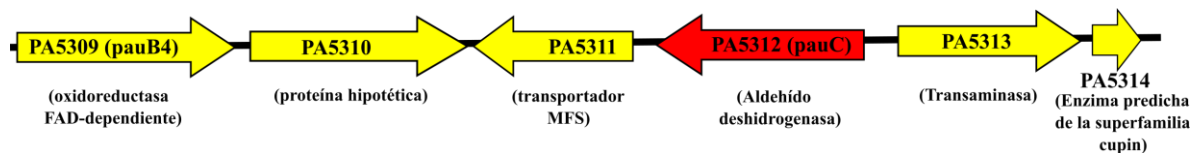


Fig. 2. Genes vecinos del gen *PapauC*

Sin embargo, hay otros genes de las diferentes rutas de degradación de poliaminas que sí se encuentran formando operones; quizás la falta de asociación de *PapauC* con cualquiera de estos operones, esté relacionada con su participación en todas las diferentes rutas de degradación mencionadas. Y también a diferencia de *E. coli* en donde la aminoaldehído deshidrogenasa (AMADH) *PuuC* parece ser una enzima redundante con otra AMADH llamada *YcdW* ya que ambas están involucradas en la oxidación de aminoaldehídos derivados del catabolismo de poliaminas (Schneider y Reitzer, 2012), en *P. aeruginosa* no existe un ortólogo de *YcdW*. *PaPauC* parecería ser la única enzima capaz de degradar *in vivo* los aminoaldehídos libres y glutamilados, dado que una cepa de *P. aeruginosa* que carece de actividad *PaPauC* es incapaz de crecer en las poliaminas como únicas fuentes de carbono y nitrógeno (Yao *et al.*, 2011). Además, se ha reportado que extractos crudos de células de *P. aeruginosa* crecidas en medios que contenían Arg, Put o Agm como únicas fuentes de carbono y nitrógeno presentaban actividad ALDH con el primer aldehído formado en la degradación de estos compuestos—GdBAL en el caso de Arg y ABAL en el caso de Put y Agm—, mientras que en extractos celulares de una cepa mutante en el gen *pauC* dicha actividad fue despreciable (Jann *et al.*, 1988). Por tanto, las otras tres enzimas con actividad AMADH que posee esta bacteria—*PaBADH* (codificada por el gen PA5373), PA4189 y PA0219—no pueden suplir a *PaPauC*, probablemente por diferencias en especificidad por los aminoaldehídos y/o en los compuestos que inducen la expresión de los genes que las codifican: colina en el caso de *PaBADH* (Velasco-García *et al.*, 1999), histamina en el caso de PA0219 (Johnson *et al.*, 2008) y aún desconocido en el caso de PA4189.

I.5. Inducción del gen *PapauC*

El análisis transcriptómico (Yang y Lu, 2007; Chou *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2011) así como los incrementos en la actividad de ALDH utilizando ABAL y GdBAL como sustratos en células cultivadas en poliaminas (Jann *et al.*, 1988), indicaron que la expresión de *PapauC* es inducible por Arg y por las poliaminas Put, Agm y Spd (Yang y Lu, 2007; Chou *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2011). Por otra parte, mediante experimentos de cambio de movilidad electroforética se ha demostrado que la región promotora del gen *papauC* une a una proteína represora transcripcional llamada PauR—codificada por PA5301 (*pauR*) en el genoma de PAO1—(Chou *et al.*, 2013). Sin embargo, no se ha comprobado experimentalmente la represión del promotor *papauC* por PauR.

I.6. Reactividad y toxicidad de los aldehídos

Los aldehídos formados como resultado de la oxidación de poliaminas, incluida la acroleína, que se produce en forma espontánea a partir de APAL, tienen efectos tóxicos significativos (Pegg, 2013). La diferencia en la potencia de esta toxicidad sobre los diferentes microorganismos es resultado de una serie de factores que incluyen su (i) reactividad, (ii) el sitio donde se generan, y (iii) la actividad de los mecanismos detoxificantes (Pegg, 2013). La detoxificación metabólica de los aldehídos puede ser llevada a cabo por las reacciones de las ALDHs y aldo-ceto reductasas, o por reacciones no enzimáticas que limitan su reactividad (por ejemplo, la ciclación del ABAL). Pero otras reacciones no enzimáticas potencian su toxicidad (por ejemplo, la formación de acroleína a partir del APAL o de la espermina o la espermidina oxidadas en el amino terminal) (Pegg, 2013).

La toxicidad del APAL se ha explicado por la formación de la acroleína, altamente reactiva, por β -eliminación espontánea (Alarcón, 1964), aunque aún no se sabe hasta qué punto esta reacción puede ocurrir en un contexto celular donde su oxidación, reducción enzimática o su reacción directa con componentes celulares proporciona rutas alternativas para su eliminación. El APAL también puede ser tóxico por sí solo al formar derivados covalentes con los grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas (Ivanova *et al.*, 2002). El ABAL también es tóxico (Wood *et al.*, 2007), aunque mucho menos que el APAL debido a que en solución su cadena alifática, con un carbono más que la del APAL, forma por ciclación la Δ^1 -pirrolina que no es reactiva.

I.7. Mecanismo químico de las aldehído deshidrogenasas

Una vez que el nucleótido oxidado y el aldehído se han unido al sitio activo de la enzima, el mecanismo químico propuesto para la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas (Feldman y Weiner, 1972, y revisado en Muñoz-Clares *et al.* 2010, y Muñoz-Clares *et al.*, 2011) consiste en una catálisis covalente y ácido-básica que consta de tres pasos principales (Fig. 3). El primero es la formación de un enlace covalente entre la enzima y el aldehído: la cisteína catalítica realiza un ataque nucleofílico al carbono del carbonilo y forma un intermediario tiohemiacetal tetraédrico. En el segundo paso se da la transferencia del hidruro desde el intermediario tiohemiacetal al nucleótido (NAD^+ o NADP^+) cuando el par de electrones del oxianión regenera la hibridación sp^2 del carbono carbonílico para formar el intermediario tioéster. El tercer paso es una desacilación, en el que se hidroliza el enlace tioéster por un ataque nucleofílico de un ion hidróxido, proveniente de una molécula de agua hidrolítica, lo que libera el grupo tiol de la cisteína catalítica y el producto ácido de la

reacción. Esta molécula de agua requiere ser "activada" por un residuo de glutámico "catalítico" que es la base que toma el protón de la molécula de agua para que la enzima esté activa a pH fisiológico. Finalmente, ocurre la liberación de los productos en forma ordenada: primero el ácido y después el nucleótido reducido, regenerándose la enzima libre.

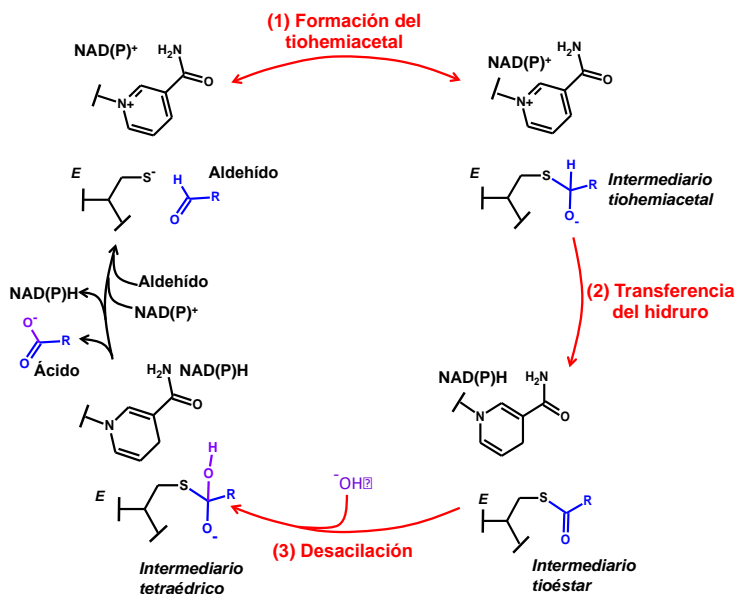


Fig. 3. Mecanismo químico de la reacción catalizada por las ALDHs hidrolíticas. Adaptado de Muñoz-Clares *et al.*, 2011

I.8. Mecanismo cinético de las ALDHs

El mecanismo cinético descrito para la mayoría de las ALDHs es un Bi Bi ordenado en estado estacionario (Fig. 4), en el que el primer sustrato en unirse a la enzima es el NAD(P)⁺ y el último producto en disociarse es el NAD(P)H (Feldman y Weiner, 1972, y revisado en Muñoz-Clares *et al.*, 2010).

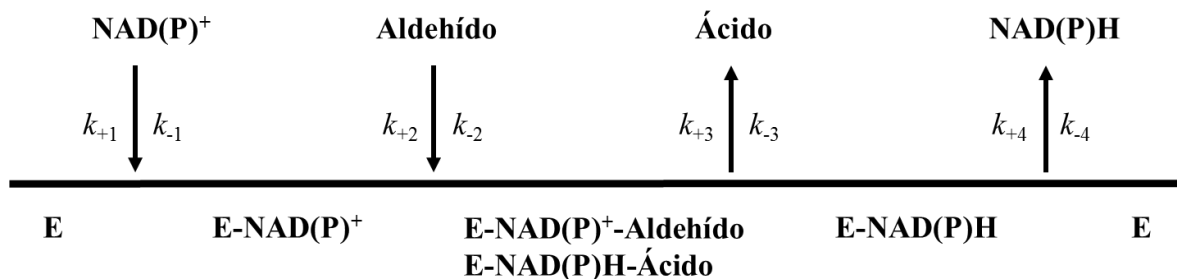


Fig. 4. Mecanismo cinético Bi Bi ordenado en estado estacionario propuesto para las ALDHs. El NAD(P)^+ es el sustrato que se une primero al sitio activo de la enzima y el NAD(P)H es el último producto que se libera del sitio activo. k_{+1} , k_{-1} , k_{+2} , k_{-2} son las constantes de velocidad de los pasos de entrada de los sustratos al sitio activo y k_{+3} , k_{-3} , k_{+4} , k_{-4} son las constantes de velocidad de los pasos de salida de los productos.

En las enzimas betaína aldehído deshidrogenasas (BADHs) de hojas de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) y de riñón de cerdo (Figuerola-Soto y Valenzuela-Soto, 2000) con base en la inhibición mixta del NADH frente al NAD^+ se propuso el mismo mecanismo ordenado, pero con carácter Iso, Es decir, se propuso que después de liberarse el nucleótido reducido ocurre un cambio conformacional en la enzima libre antes de que pueda iniciarse un nuevo ciclo catalítico. Pero aún no se conoce en qué consiste ese paso de isomerización y ciertos datos experimentales sugieren una explicación alternativa a la inhibición mixta del NADH frente al NAD^+ , que podría deberse a cierto grado de azar en la liberación del NADH , antes o después de que ocurra el paso de hidrólisis de la reacción catalizada (Cardona-Cardona y Muñoz-Clares, resultados no publicados). También, se ha reportado un mecanismo Ping-Pong para las enzimas BADH del hongo *Cylindrocarpon didymum* (Mori *et al.*, 1980) y de la bacteria *Escherichia coli* (Falkenberg y Strøm, 1990). En este tipo de mecanismo se une el primer sustrato a la enzima, a la que le transfiere un grupo formando así el primer producto que se libera antes de que entre el segundo sustrato, el que recibe de la enzima el grupo que le transfirió el primer sustrato y se forma así el

segundo producto. Sin embargo, este mecanismo cinético no es consistente con el mecanismo químico reportado para las ALDHs en general.

Para varias ALDHs se ha reportado la inhibición de su actividad enzimática por altas concentraciones del sustrato aldehído, y probablemente ésta sea una característica general de estas enzimas, si bien no se detecta si las cinéticas de saturación se hacen en intervalos de concentración de sustrato no muy grandes. Se han propuesto varios mecanismos tratando de explicar esta inhibición, algunos de los cuales contemplan (i) la formación de un complejo ternario no productivo E-NAD(P)H-aldehído del cual se puede liberar el NAD(P)H (Rivett y Tipton, 1981; Hart y Dickinson, 1982; Vojtechová *et al.*, 1997; Muñoz-Clares y Casanova-Figueroa, 2019); (ii) la unión del sustrato aldehído al sitio de unión de la coenzima en competencia con esta (Henehan y Tipton, 1992; Marchal *et al.*, 2000; Jang *et al.*, 2015); (iii) unión no productiva (Chen *et al.*, 2014) o unión de dos moléculas de aldehído (Kopečný *et al.*, 2011) en el sitio de unión al aldehído; y (iv) unión de la molécula de sustrato inhibidora a un sitio alostérico inhibidor (Forte-McRobbie y Pietruszko, 1986; Chen *et al.*, 2014). Sin embargo, una inhibición competitiva del sustrato frente al sustrato, ya sea producida por unión no productiva de un sustrato al sitio activo o por su unión a un sitio alostérico, nunca puede dar lugar a inhibición por sustrato. Lo que causa es una disminución en V_{\max} y en K_m por un mismo factor que no depende de la concentración de sustrato, y por eso puede pasar desapercibida. Además, la inhibición se ha visto que es de tipo incompetitivo con respecto al NAD^+ , por tanto, no se origina por unión del sustrato al sitio de unión de la coenzima, y que es favorecida por NADH (Vojtechová *et al.*, 1997), lo que es consistente con el primero de los mecanismos mencionados y que se muestra en la Fig. 5.

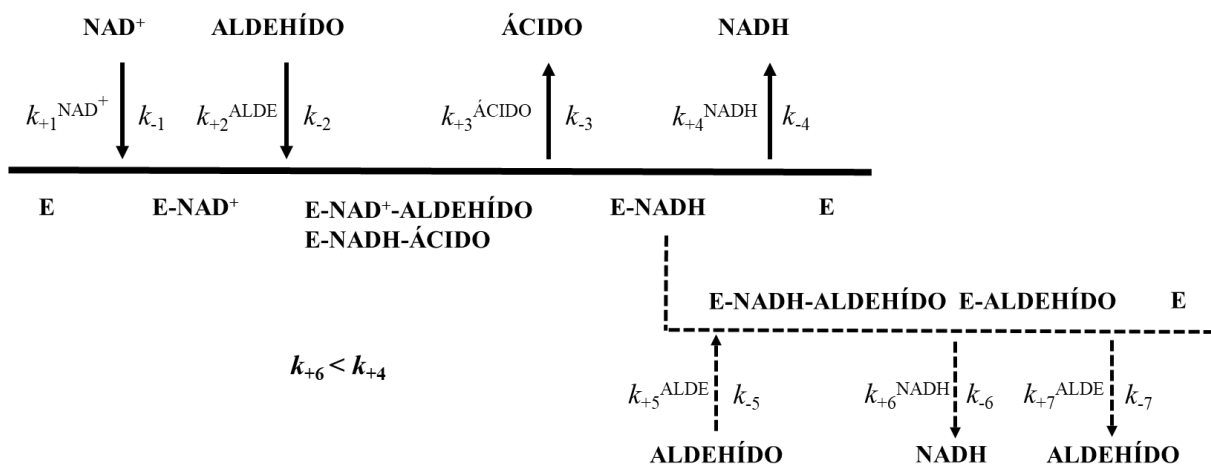


Fig. 5. Mecanismo de inhibición propuesto para las enzimas ALDHs a altas concentraciones de aldehído. En la figura las líneas sólidas indican la ruta no inhibida y las líneas punteadas indican la ruta alterna, inhibida, de la reacción en la que el NADH puede liberarse del complejo E-NADH-Aldehído.

I.9. Estructura tridimensional de *PaPauC*

La estructura tridimensional de la enzima *PaPauC* a 2.55 Å de resolución (código PDB 6B4R) se obtuvo durante mis estudios de maestría (Cardona-Cardona, 2017). El cristal pertenece al grupo espacial C121 y contiene cuatro subunidades en la unidad asimétrica, que corresponde a la unidad biológica de la enzima (un homotetrámero que es un dímero de dímeros). Como en todas las enzimas de la superfamilia de las ALDHs de estructura 3D conocida, cada subunidad del tetrámero posee un sitio activo y está formada por tres dominios característicos del plegamiento de estas enzimas: dominio de oligomerización, dominio de unión a la coenzima y dominio catalítico en el que se encuentra el sitio activo de la enzima (Liu *et al.*, 1997). En este último dominio, en un asa que se ha llamado asa catalítica y que forma un giro beta de tipo I (Muñoz-Clares *et al.*, 2017), se encuentra la cisteína catalítica C302, que está conservada en todas las ALDHs con estructura tridimensional conocida. Se sabe que la cisteína catalítica puede adoptar dos conformaciones: i) “de ataque” cuando está

en la posición adecuada para realizar el ataque nucleofílico al carbonilo del aldehído y ii) “de descanso” cuando está alejada del carbono carbonílico del aldehído (Muñoz-Clares *et al.*, 2011). Otro residuo importante para la catálisis y que está presente en este dominio es el glutámico catalítico, que activa la molécula de agua para realizar el ataque nucleofílico al tioéster. Este residuo puede adoptar tres conformaciones: i) “hacia adentro” que es estéricamente incompatible con la coenzima oxidada unida; en esta conformación el glutámico catalítico puede activar a la cisteína catalítica para el ataque nucleofílico, ya que el grupo carboxilo está cerca del tior; ii) la conformación “intermedia” es estéricamente compatible con la coenzima oxidada; se cree que es la adecuada para la activación de la molécula de agua hidrolítica y iii) la conformación “hacia afuera” en la que libera el protón que había tomado previamente, ya sea de la cisteína catalítica o del agua hidrolítica (González-Segura *et al.*, 2009; Muñoz-Clares *et al.*, 2011). Finalmente, en el sitio activo también se encuentra la asparagina catalítica N168, la cual junto con el nitrógeno amídico de la cisteína catalítica forman el hoyo del oxianión, cuya función es estabilizar la carga negativa generada en el intermediario tetraédrico (Wang y Weiner, 1995; Hempel *et al.*, 1999; Mann y Weiner, 1999, Muñoz-Clares *et al.*, 2015).

En las cuatro subunidades de la estructura cristalográfica de *PaPauC* encontramos a la cisteína catalítica (C302) en la conformación llamada “de descanso” y al Glu catalítico (E267) en la conformación “intermedia”. La asparagina catalítica (N168) está en la posición observada en el resto de los cristales de ALDHs reportados a la fecha. En el sitio de unión del aldehído, encontramos tres residuos aromáticos (F169, W176 y F467) que forman una “caja de aromáticos” que, en otra AMADH, la betaína aldehído deshidrogenasa de espinaca, se ha demostrado que participa en la unión del aminoaldehído en el sitio activo mediante

interacciones catión- π (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012). Este arreglo de residuos aromáticos se ha encontrado también en el sitio activo de otras ALDHs cuyos sustratos no son aminoaldehídos (Riveros-Rosas *et al.*, 2013), por lo que es probable que, al menos algunos de los residuos que la forman, cumplan otras funciones importantes en la catálisis de las ALDHs en general.

En cuanto al sitio de unión de la coenzima, *PaPauC* posee un residuo de glutámico (E194) en la posición equivalente al E195 de la ALDH2 y un residuo de tirosina (Y223) en la posición equivalente a la 223 en ALDH2, que son las posiciones que determinan la especificidad por NAD^+ o NADP^+ (González-Segura *et al.*, 2015). En este caso, la presencia de dichos residuos es consistente con el uso exclusivo de NAD^+ , ya que no puede unir al NADP^+ como se reportó en mis estudios de maestría. Ello se debe a las repulsiones electrostáticas y estéricas entre E194 y el grupo 2'-fosfato de la ribosa de la adenosina del NADP^+ . La cadena lateral voluminosa de la Y223 impide el movimiento de la cadena lateral de E194 para dar espacio al grupo 2'-fosfato del NADP^+ , de manera que Glu194 solo pueda interactuar con el grupo 2'-OH de la ribosa de la adenosina del NAD^+ , que es más pequeño y sin carga.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pensamos que *PaPauC* es un blanco potencial de fármacos contra las infecciones del patógeno *P. aeruginosa* porque es una enzima que participa en rutas catabólicas de compuestos fisiológicamente importantes, y por ello pudiera ser esencial para el crecimiento y/o virulencia de la bacteria. Además, se espera que esta enzima sea menos propensa a mutaciones genéticas que confieren resistencia a los fármacos debido a la regla de centralidad-letalidad (Jeong *et al*, 2001), la cual propone que hay mayor probabilidad de letalidad para un organismo si se elimina una proteína altamente conectada que una proteína poco conectada. Todo esto, aunado a que no existen ortólogos cercanos de esta enzima en humano (el ortólogo es la ALDH9A1, cuyo grado de identidad con *PaPauC* es solo del 34 %) y, sobre todo, a que su inhibición incrementaría los niveles intracelulares de los aldehídos que oxida, algunos de los cuales como el APAL y su producto de β -eliminación espontánea la acroleína, son compuestos altamente tóxicos (Wood *et al*, 2007; Pegg, 2013; Agostinelli, 2020).

Por ello, nuestro interés en este proyecto de investigación es doble: (1) validar a *PaPauC* como un blanco de fármacos y de resultar serlo, (2) investigar las bases estructurales de su especificidad por el aldehído, lo que sería de ayuda para la identificación o diseño en un futuro de compuestos inhibidores de esta enzima que pudieran usarse como fármacos, o como compuestos líderes para el desarrollo de nuevos fármacos.

Para alcanzar el primer objetivo, realizamos experimentos de crecimiento bacteriano y estudiamos los efectos que la ausencia de la enzima *PaPauC* tiene sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* en los compuestos en cuyos catabolismos participa. Para el segundo, ampliamos los estudios previos de caracterización cinética y estructural de *PaPauC*

reportados en mi tesis de maestría (Cardona-Cardona, 2017), con el fin de identificar residuos de aminoácidos importantes para su especificidad por el aldehído, que permitan la selección o diseño de inhibidores específicos.

III. HIPÓTESIS

La enzima *PaPauC* es un blanco potencial de fármacos contra infecciones de *P. aeruginosa* porque su inhibición llevará a la acumulación en la bacteria de aldehídos tóxicos producidos en el catabolismo de poliaminas. Y el conocer las características estructurales del sitio activo que determinan la especificidad de esta enzima por sus sustratos aldehído será de utilidad para el diseño o selección de inhibidores específicos.

IV. OBJETIVOS

IV.1. Objetivo general

Estudiar la relevancia de la actividad de la enzima *PaPauC* en el catabolismo y toxicidad de las poliaminas en *P. aeruginosa* y conocer las bases estructurales de la especificidad de esta enzima por los aldehídos que sean sus sustratos fisiológicos.

IV.2. Objetivos específicos

- Investigar si la enzima *PaPauC* recombinante es capaz de oxidar los aldehídos propuestos como sustratos fisiológicos y con qué eficiencia lo hace.
- Determinar si la actividad *PaPauC* y los niveles de expresión del gen *papauC* se incrementan en células crecidas en diferentes poliaminas.
- Validar la importancia de *PaPauC* en el catabolismo de poliaminas en *P. aeruginosa* investigando si se inhibe o se anula el crecimiento en estos compuestos como única fuente de carbono y nitrógeno en una cepa mutante nula obtenida por inserción de un transposón en el gen que codifica a esta enzima.
- Evaluar la toxicidad de las poliaminas y de sus intermediarios aldehídos en el crecimiento de la cepa silvestre de *P. aeruginosa* MPAO1 y de la cepa mutante con el transposón insertado.
- Identificar residuos del sitio activo potencialmente importantes para determinar la especificidad de la enzima *PaPauC* por sus sustratos aldehído, haciendo uso de la estructura cristalográfica y de simulaciones de acoplamiento molecular.
- Comprobar la importancia de estos residuos sustituyéndolos individualmente por alaninas y caracterizando cinéticamente a las variantes de la enzima que se obtengan.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1. Compuestos químicos

NAD⁺, β-mercaptoetanol, diclorhidrato de putrescina, diclorhidrato de cadaverina, 1,3-diaminopropano, espermina, espermidina, ácido N-(benciloxycarbonil)-L-glutámico, cloruro de pivaloílo, hidrocloreuro de O-metilisourea, cloruro de metilo, sílica gel y las formas dietilacetiladas de ABAL y APAL se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Todos los demás productos químicos de grado analítico procedían de proveedores estándar. Las formas dietil acetiladas del GluAPAL y el GluABAL se sintetizaron mediante un nuevo procedimiento descrito más adelante y representado en la Fig. 6A. Las formas dietil acetiladas del GdBAL y el TMABAL también fueron sintetizadas mediante procedimientos previamente descritos (Vaz *et al.*, 2000; Patel *et al.*, 2015) y presentados en la Fig. 6B y 6C. Las formas libres de GluAPAL, APAL, GluABAL, ABAL, GdBAL y TMABAL se obtuvieron hidrolizando los correspondientes dietil acetales en HCl 0.2 N a 60 °C durante 15 min. La concentración exacta de los aldehídos libres resultantes se determinó en cada experimento midiendo la cantidad de NADH producido después de su oxidación completa en la reacción catalizada por PaPauC en presencia de un exceso de NAD⁺.

V.2. Síntesis química de aldehídos

Las siguientes síntesis químicas se llevaron a cabo con la colaboración del grupo del Dr. Ignacio Regla del Laboratorio de Síntesis de Fármacos de la FES Zaragoza, UNAM. La identidad del GdBAL y el TMABAL se confirmó por ¹H y ¹³C RMN llevados a cabo por la Unidad de Servicios para la Industria y la Investigación (USAII), Facultad de Química, UNAM. La identidad del GluAPAL y el GluABAL se confirmó por ¹H, ¹³C, DEPTQ135,

COSY, HMBC y HSQC RMN llevados a cabo por el INECOL, Instituto de Ecología, A.C. de la ciudad de Xalapa, Veracruz (Apéndice I).

Los dietil acetales de GluAPAL y GluABAL se sintetizaron en una reacción que consta de dos etapas. En la primera, el compuesto éster α -monobencílico del ácido N-(benciloxicarbonil)-L-glutámico—que tiene los grupos α -amino y α -carboxilo del glutámico protegidos pero el grupo carboxilo de la cadena lateral del Glu libre—se sintetizó utilizando el ácido N-(benciloxicarbonil)-L-glutámico y el alcohol bencílico como se describe más adelante. Este compuesto se purificó mediante cromatografía en columna obteniéndose una goma incolora que solidificó en el congelador, con un rendimiento del 71%. En la segunda etapa, este compuesto se mezcló con APAL dietil acetal o ABAL dietil acetal en las condiciones descritas más adelante en presencia de trietilamina y cloruro de pivaloílo como agente activante. En esta reacción el cloruro de pivaloílo forma un anhídrido mixto con el grupo carboxilo libre, que luego puede ser sustituido por el respectivo aminoaldehído dietil acetal. Finalmente, los grupos protectores del α -amino y del α -carboxilo del glutámico se eliminaron mediante hidrogenación catalítica. El proceso de la reacción se muestra en la Fig. 6. Todos los intermediarios se evaluaron mediante cromatografía en capa fina y se purificaron por cromatografía en columna. Los productos finales se caracterizaron por $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPTQ135, COSY, HMBC y HSQC NMR. Los resultados de estos análisis se muestran en el Apéndice I.

V.2.1. Síntesis del 4-glutamilaminobutiraldehído dietil acetal

Se calentó una suspensión de ácido N-(benciloxicarbonil)-L-glutámico (5.0 g) (**1**) en

anhídrido acético (15 mL) a 60 °C hasta que se obtuvo una solución transparente. Esta solución se agitó magnéticamente durante 14 h a temperatura ambiente y se calentó durante 30 minutos a 70 °C. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta sequedad a 70 °C para producir una goma incolora (4.6 g) que se disolvió en tolueno (40 mL). Luego, se añadió alcohol bencílico (1.94 mL) y la solución se agitó magnéticamente durante 48 h a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se concentró a sequedad al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (MTBE/heptano 1:1), produciendo una goma incolora del éster α -monobencil N-(benciloxicarbonil)-L-glutaminato (**2**), que solidificó en el congelador. Luego, se preparó glutaminato de N²- (benciloxicarbonil) -N⁵- (4,4-dietoxibutil) -L-bencilo disolviendo el compuesto (**2**) (1.3 g) en diclorometano (13 mL) en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se enfrió a 0 °C y se añadió trietilamina (1.5 mL), seguido de cloruro de pivaloilo (0.44 mL). La mezcla resultante se mantuvo con agitación a 0 °C durante 40 min. A continuación, se añadió una solución de ABAL dietil acetal (0.71 mL) en diclorometano (5 mL). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 12 h, tras lo cual se lavó tres veces con salmuera (10 mL). Posteriormente, la fase orgánica se concentró a sequedad con sulfato de sodio anhidro. Finalmente, se preparó 4-glutamilaminobutiraldehído dietil acetal (**3**). En una botella de hidrogenación, se disolvió N²- (benciloxicarbonil) -N⁵- (4,4-dietoxibutil) -L-bencil glutaminato (1.4 g) en metanol (25 mL) y se añadió paladio sobre carbono al 5% (1.4 g). La mezcla se agitó a 50 psi de presión de hidrógeno durante 6 horas tras lo cual se filtró sobre celita. Finalmente, el filtrado se evaporó a sequedad para obtener el dietil acetal de GluABAL sólido (0.7 g; 74%), que se recristalizó en etanol, obteniéndose 0.44 g (47%) del compuesto final con un punto de fusión de 170 °C. Los desplazamientos químicos que identifican al GluABAL dietil acetal en RMN son: ¹H NMR (D₂O, 500 MHz) δ 4.56 (1H, t, J = 5.5 Hz), 3.68 (1H, t, J = 5.3 Hz), 3.68-3.61 (3H, m), 3.58-3.48 (2H, m),

3.12 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.37-2.26 (2H, m), 2.07-2.01 (2H, m), 1.57-1.52 (2H, m), 1.51-1.44 (2H, m), 1.11 (6H, t, J = 7.1 Hz, H-20); ¹³C (D₂O, 125 MHz) δ 174.4, 173.8, 102.8, 62, 54.1, 38.9, 30.3, 31.56, 30.3, 26.51, 23.4, 14.2.

V.2.2. Síntesis del 3-glutamilaminopropionaldehído dietil acetal

Este compuesto se preparó siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó para la síntesis del GluABAL, partiendo del éster α-monobencílico N-(benciloxycarbonil)-L-glutaminato (**2**) (2.5 g). A continuación, se añadió una solución de APAL dietil acetal (1.3 mL) en diclorometano (5 mL). Finalmente, se preparó GluAPAL dietil acetal (**4**). En una botella de hidrogenación, se disolvió N²-(benciloxycarbonil)-N⁵-(4,4-dietoxibutil)-L-bencil glutaminato (2.9 g) en metanol (70 mL) al que se añadió paladio sobre carbono al 5 % (0.15 g). La mezcla se agitó a 50 psi de presión de hidrógeno durante 6 horas. La mezcla se filtró sobre celita. Finalmente, el filtrado se evaporó a sequedad para obtener el GluAPAL dietil acetal sólido (1.59 g; 99%), que se recristalizó en etanol para dar 0.8 g (50%) del compuesto final con un punto de fusión de 175 °C. Los desplazamientos químicos que identifican al GluAPAL dietil acetal (**4**) en RMN son: ¹H NMR (D₂O, 500 MHz): δ 4.59 (1H, t, J = 5.8 Hz), 3.74-3.61 (3H, m), 3.58-3.48 (2H, m), 3.18 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.39-2.25 (2H, m), 2.04 (2H, q, J = 7.4 Hz), 1.76, (2H, q, J = 6.5 Hz), 1.11 (6H, t, J = 7.0 Hz). ¹³C (D₂O, 125 MHz) δ 174.3, 173.8, 101.4, 62.8, 54.1, 35.2, 32.5, 31.5, 26.4, 14.3.

V.2.3. Síntesis del cloruro de 4-trimetilaminobutiraldehído dietil acetal

El TMABAL fue sintetizado siguiendo el método descrito por Vaz *et al.*, 2000. Brevemente, en un reactor de acero inoxidable de 80 mL, se adicionó acetonitrilo (30 mL),

carbonato de potasio (1.7 g), ABAL dietil acetal (500 mg) y cloruro de metilo (1.6 g). El reactor se cerró con un manómetro y se calentó a 50 °C por aproximadamente 4 horas, observando una presión máxima de 15 psi. El término de la reacción se verificó por cromatografía en capa fina usando como fase móvil la mezcla diclorometano-metanol (DCM/MeOH) en una relación 9:1. Finalmente, la mezcla de reacción se concentró hasta sequedad en un rotavapor y se secó con alto vacío a temperatura ambiente. Se obtuvieron 650 mg (67.5 %) del cloruro de TMABAL dietil acetal. Los desplazamientos químicos que identifican al TMABAL dietil acetal en RMN son: **¹H RMN (400 MHz, D₂O):** δ (ppm) 4.59 (t, J= 5.5 Hz, 1H), 3.75 - 3.42 (m, 5H), 3.29 - 3.17 (m, 2H), 1.86 - 1.65, (m, 2H), 1.61 - 1.51 (m, 2H), 1.10 (t, J= 7.1 Hz, 6H). **¹³C RMN (100 MHz, D₂O):** δ(ppm) 100.06 (O-CH-O, C-5), 63.72 (CH₂, C-8), 60.70 (CH₂, C-2), 50.54 (CH₃, C-9), 50.46 (CH₃, C-10), 50.40 (CH₃, C-11), 27.49 (CH₂, C-6), 15.50 (CH₂, C-1,4), 12.05 (CH₃, C-7)

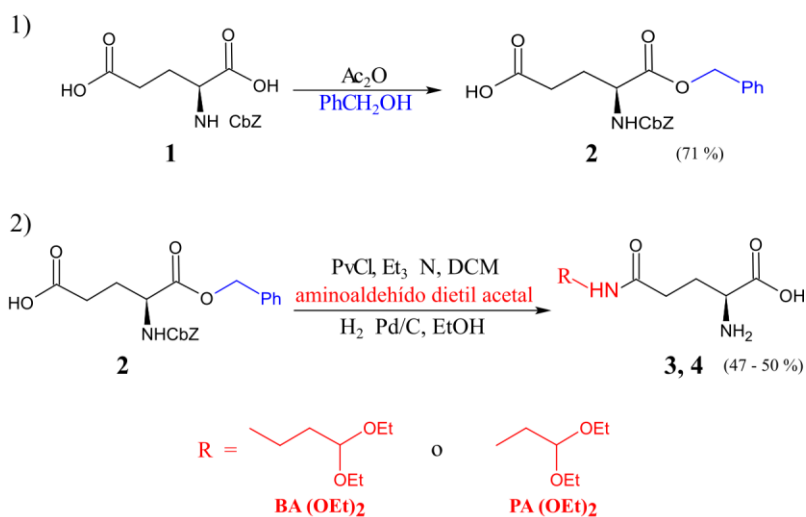
V.2.4. Síntesis del cloruro de 4-guanidinabutiraldehído dietil acetal

La síntesis de este compuesto se llevó a cabo reproduciendo el procedimiento reportado por Patel *et al*, 2015. Brevemente, se disolvió ABAL dietil acetal (0.54 mL) y trietilamina (0.42 mL) en metanol (45 mL) y se añadió hidrocloreuro de O-metilisourea (0.39 g). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. El disolvente se evaporó y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna (EtOAc/CHCl₃/MeOH; 1:1:0 a 1:1:0.2) para dar el producto puro deseado, verificado por resonancia magnética nuclear. Se obtuvieron 0.41 g (57%) de una goma incolora que solidificó en el congelador. Los desplazamientos químicos que identifican al GdBAL dietil acetal en RMN son: **¹H NMR (400 MHz, D₂O)** δ: 4.68 (t, J = 5.2 Hz, 3H), 3.72- 3.8 (m, 2H), 3.69 – 3.58 (m, 2H), 3.23 (t,

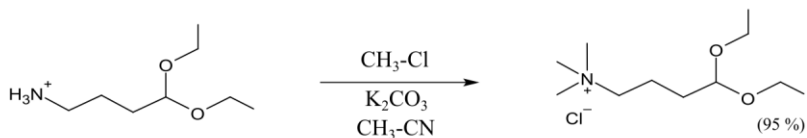
$J = 6.4$ Hz, 2H), 1.73 – 1.63 (m, 4H), 1.22 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, D₂O)

δ : 156.61, 102.69, 62.55, 40.58, 30.06, 23.06, 14.19.

A



B



C

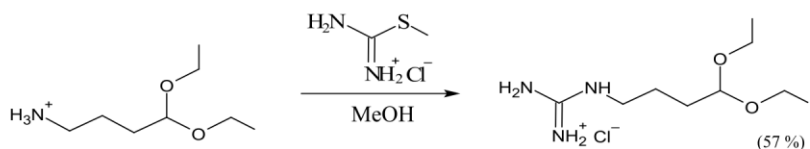


Fig. 6. Síntesis de aldehídos. (A) Formas dietil acetiladas del GluABAL (3) y GluAPAL, (4). 1, ácido N-(benciloxicarbonil)-L-glutámico 2, ácido N-(benciloxicarbonil)-L-glutámico α -monobencil éster. Ac₂O, anhídrido acético; PhCH₂OH, alcohol bencilico. PvCl, cloruro de pivaloílo; Et₃N, trietilamina; DCM diclorometano; H₂ Pd/C hidrogenación catalítica; EtOH etanol; BA(OEt)₂, butiraldehído dietil acetal, PA(OEt)₂, propionaldehído dietil acetal. (B) Forma dietil acetilada del TMABAL. CH₃Cl, cloruro de metilo. (C) Forma dietil acetilada del GdBAL. C₂H₇ClN₂S, cloruro de O-metilisourea; MeOH, metanol.

De los cuatro aldehídos no disponibles comercialmente que se sintetizaron para la caracterización cinética de la enzima *PaPauC* en este trabajo, hasta donde sabemos, este es

el primer informe de la síntesis del GluAPAL y el GluABAL y de sus pruebas como sustratos de cualquier enzima ALDH. La importancia de estos compuestos radica en que han sido propuestos como los principales aldehídos intermediarios del catabolismo de poliaminas (Yao *et al*, 2011; Chou *et al*, 2013).

V.3. Expresión y purificación de la enzima recombinante *PaPauC*

El gen PA5312 (*PapauC*) se clonó a partir del DNA genómico de la cepa PAO1 de *P. aeruginosa* como se describió en mi tesis de maestría (Cardona-Cardona, 2017). La enzima *PaPauC* recombinante se sobre expresó en células de *E. coli* BL21 (DE3) (Agilent) transformadas con el plásmido pET28b(+)-*PapauC*—que contiene la secuencia completa del gen *pauC* de *P. aeruginosa*—el cual añade una etiqueta de His en el N-terminal de la proteína recombinante. Las células se cultivaron en medio LB líquido en presencia de kanamicina (0.1 mg/mL) a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) entre 0.5 y 0.7 unidades de absorbancia. En ese momento se indujo la síntesis de la enzima *PaPauC* con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.1 mM, y se continuó la incubación por 4 horas más. La enzima se purificó hasta homogeneidad en un solo paso mediante cromatografía de afinidad usando una columna *Protino*® *Ni-NTA Agarose* (Macherey-Nagel, EUA), que se basa en la interacción específica y reversible entre la enzima obtenida con una etiqueta de histidinas y los iones de níquel (II) de la resina. Para ello, las bacterias, crecidas como se describió anteriormente, se centrifugaron a 6,000 rpm durante 5 min, a 10 °C, desechando el sobrenadante. El sedimento de células obtenidas se resuspendió en 10 mL de un amortiguador de fosfatos de potasio/KOH 50 mM, pH 7.0, KCl 50 mM, glicerol 10 % (v/v), β-mercaptoetanol 10 mM (amortiguador de extracción) y se obtuvo el extracto crudo por

ruptura de las células por ultrasonido en intervalos de 45 s encendido y 45 s apagado para completar un tiempo total de 15 min de sonicación a una amplitud del 21 %. Posteriormente, la solución se centrifugó a 6,000 rpm por 15 min y el sobrenadante se pasó a través de la columna de afinidad de 10 mL de volumen de cama, previamente equilibrada y lavada con 200 mL del amortiguador en el que se rompieron las células (amortiguador de extracción). La elución se realizó con imidazol 150 mM en 150 mL de este amortiguador. Durante la elución se colectaron fracciones de 10 mL.

V.4. Mutagénesis sitio-dirigida

El gen *pauC* de *P. aeruginosa* clonado en el vector de expresión pET28b (+) descrito anteriormente se utilizó como molde para realizar mutagénesis sitio-dirigida mediante PCR utilizando el kit Quick Change XL-II Site Directed Mutagenesis (Agilent) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los oligonucleótidos usados para generar cada mutante se muestran en la Tabla 1. Todos los productos de PCR de las mutagénesis se transformaron primero en células *E. coli* XL10-Gold (Stratagene) y se secuenciaron para confirmar que la mutación deseada estaba presente y que no se produjeron otros cambios de nucleótidos. Finalmente, todas las construcciones se transformaron para la sobreexpresión de cada proteína variante en células de *E. coli* BL21 Rosetta (DE3) (Novagen). La sobreexpresión y purificación de las variantes se llevó a cabo como se describió en el anterior apartado para la enzima silvestre. El rendimiento de la proteína recombinante funcional fue similar para la enzima *PaPauC* silvestre y sus variantes. Las concentraciones de proteína se determinaron espectrofotométricamente utilizando la absorptividad molar a 280 nm deducida de la secuencia de aminoácidos por el método de Gill y von Hippel (1989): $68,410 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

para las enzimas silvestre y las variantes, excepto para la variante W176A que fue de 62,910 $M^{-1} cm^{-1}$ (Gasteiger *et al*, 2003).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para generar cada una de las mutantes analizadas en este trabajo. La mutación puntual está subrayada en cada secuencia.

Mutante	Oligo	Secuencia 5'→3'
F169A	sentido	ATCGTGCCGTGGAAC <u>G</u> CCCCGCTGCTGATGTC
	antisentido	GACATCAGCAGCGGG <u>G</u> CGTTCCACGGCACGAT
W176A	sentido	CTGCTGATGTCCTG <u>C</u> GCGAAACTCGGTCCGGC
	antisentido	GCCGGACCGAGTTTC <u>C</u> GCAGGACATCAGCAG
T303A	sentido	GGCGAAGTCTG <u>C</u> CCGCCGGTTCGC
	antisentido	GCGAACCGGCGG <u>C</u> GCAGACTTCGCC
D459A	sentido	GTCAACCAGTACG <u>C</u> CGGCGGCGACATG
	antisentido	CATGTCGCCCGCCG <u>G</u> CGTACTGGTTGAC
D459N	sentido	GGGTCAACCAGTACA <u>A</u> CGGCGGCGACATG
	antisentido	CATGTCGCCCGCGT <u>T</u> GTACTGGTTGACCC
F467A	sentido	ACATGACCGCTCCG <u>G</u> CCGGCGGCTTCAAGC
	antisentido	GCTTGAAGCCCGC <u>G</u> CCGGAGCGGTCATGT
K479A	sentido	CAACGGTCGCGAC <u>G</u> CGTCGCTGCACGCC
	antisentido	GGCGTGCAGCGAC <u>G</u> CGTCGCGACCGTTG

V.5. Ensayo de actividad de la *PaPauC* recombinante

La actividad enzimática se ensayó espectrofotométricamente siguiendo la producción de NADH a 340 nm ($\epsilon = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 30 °C. Para el ensayo se usaron cubetas de 1.0 cm de paso de luz en un volumen final de 0.5 mL que contenía amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 8.0 y una concentración de NAD⁺ fija de 600 μM . Estimamos que esta concentración de NAD⁺ está cerca de la concentración fisiológica dado que es la concentración intracelular reportada para las células de *E. coli* (Zhou *et al*, 2011). La concentración exacta de NAD⁺ se determinó por su absorbancia a 260 nm utilizando una absortividad molar de 18,000 $\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Dawson *et al*, 1986). Todos los ensayos se iniciaron mediante la adición de la enzima. Las velocidades iniciales en estado estacionario se determinaron a partir de las porciones lineales iniciales de los cursos temporales de la reacción.

V.6. Determinación de los parámetros cinéticos de la *PaPauC* recombinante con diferentes aldehídos

En los experimentos de estado estacionario de saturación de la enzima por el aldehído, los datos de velocidad inicial se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o a la ecuación de Michaelis-Menten que contempla la inhibición parcial por sustrato (Ec. 2):

$$v_0 = V_{\max} [S]/(K_m + [S]) \quad (\text{Ec. 1})$$

$$v_0 = [S] (V_{\max} + V_{\max \text{ inh}} [S]/K_{iS})/\{K_m + [S](1 + [S]/K_{iS})\} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde v_0 es la velocidad inicial, V_{\max} es la velocidad máxima, $V_{\max \text{ inh}}$ es la velocidad máxima inhibida, $[S]$ es la concentración del aldehído variable, K_m es la concentración de sustrato a la mitad de la velocidad máxima y K_{iS} es la constante de inhibición del sustrato variable.

V.7. Caracterización fisicoquímica de *PaPauC*

El estado de asociación de la proteína fue evaluado por cromatografía de exclusión molecular (SEC) en una columna Superdex 200 HR-10/300 acoplada a un equipo ÄKTA PURE FPLC (Cytiva). Se utilizó una concentración de proteína de 1 mg/mL. La estabilidad térmica de *PaPauC* recombinante se determinó midiendo el cambio en la intensidad de fluorescencia del fluoróforo SYPRO Orange (Sigma Aldrich) durante la desnaturalización térmica en un sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems). La proteína (1.9 mg/mL) se puso en el mismo amortiguador que el del experimento de SEC. Las transiciones de desnaturalización térmica se analizaron mediante la ecuación de Boltzman. El intervalo de temperatura usado en estos experimentos fue de 25 a 99.9 °C y la velocidad del cambio de temperatura de 0.5 °C / min.

V.8. Validación de la cepa mutante *pauC::ISlacZ* de *P. aeruginosa*

La cepa mutante PA5312-A09::*ISlacZ*/hah (de aquí en adelante llamada *pauC::ISlacZ*) posee la inserción del transposón *ISlacZ*/hah en el gen *PapauC*. Esta inserción se confirmó mediante la técnica de PCR utilizando DNA genómico de la cepa MPAO1, DNA genómico de la cepa PA5312-A09::*ISlacZ*/hah y los mismos oligonucleótidos sentido (5'-GGAATTCCATATGACCACCCTGACCCGCG-3') y antisentido (5'-CCGCTCGAGTCAGAGCTTGATCCAGGTCG-3') diseñados para clonar el gen *PapauC* (Cardona-Cardona *et al*, 2017).

V.9. Crecimientos de las cepas silvestre y mutante *pauC::ISlacZ* de *P. aeruginosa* e inhibición del crecimiento bacteriano

Las cepas de *P. aeruginosa* MPAO1 y la mutante *pauC::ISlacZ* se obtuvieron de la biblioteca de mutantes por inserción de transposón de *P. aeruginosa* (Jacobs *et al*, 2003) de la Universidad del Estado de Washington, WA, USA. Las células de *P. aeruginosa* silvestres MPAO1 y mutantes *pauC::ISlacZ* se cultivaron durante la noche a 37 ° C y 200 rpm en medio Luria-Bertani (LB) (células silvestres) o en este medio suplementado con 10 µg/mL de tetraciclina (células mutantes). A partir de estos cultivos, se inocularon medios LB frescos y se dejaron crecer durante 6 h. Luego, las células se recolectaron y se lavaron dos veces con un medio mínimo M9 modificado (Na₂HPO₄ 48 mM, KH₂PO₄ 22 mM, NaCl 8,6 mM, CaCl₂ 0,1 mM, MgSO₄ 1 mM, pH 7.2), que no contenía ninguna fuente de carbono o nitrógeno. De esta suspensión se tomó un volumen apropiado para inocular a una D.O. de 0.1 el medio mínimo M9 modificado que contiene glucosa a la concentración indicada en la sección de Resultados más NH₄Cl 15 mM y/o poliaminas o aldehídos a la concentración establecida en cada experimento. Las células se cultivaron durante 24 h y posteriormente se evaluó el crecimiento bacteriano midiendo la densidad óptica del medio de cultivo a 600 nm.

De la misma forma se evaluaron los efectos sobre el crecimiento de las cepas MPAO1 y *pauC::ISlacZ* para determinar la inhibición del crecimiento de las células por las poliaminas y los aldehídos en medio líquido a 37 °C. Para ello, se añadió en el medio mínimo M9 modificado alguno de los compuestos indicados en cada experimento a las concentraciones mostradas en la sección de Resultados.

V.10. Determinación de actividad ALDH en extractos crudos

Las células MPAO1 silvestre y mutante se cultivaron durante 24 h usando los sustratos de crecimiento indicados y se recolectaron por centrifugación a $13,000 \times g$ durante 15 min y $10^\circ C$. Posteriormente se resuspendieron en amortiguador de fosfatos de potasio 50 mM, pH 7.0, que contenía KCl 50 mM, glicerol al 10% (v/v) y β -mercaptoetanol 10 mM y se rompieron por sonicación entre $0-4^\circ C$. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a $40,000 \times g$ durante 15 min y el sobrenadante se utilizó para hacer los ensayos de actividad ALDH en las condiciones estándar previamente descritas. Los sobrenadantes se mantuvieron a $4^\circ C$ como máximo un día. La concentración de proteína en los extractos crudos se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando albúmina sérica de bovino como estándar.

V.11. Determinación de los niveles de expresión del gen *PapauC*

Los experimentos de RT-qPCR se llevaron a cabo con la colaboración del Dr. Javier Andrés Juárez Díaz del Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, UNAM. Mediante centrifugación a $6,000 \times g$ durante 5 min a $4^\circ C$, se recolectaron dos conjuntos independientes de células de *P. aeruginosa* MPAO1 crecidas durante 24 h con los sustratos de crecimiento indicados y dos conjuntos de células de la cepa *pauC::ISlacZ* crecidas con Gluc 20 mM más NH_4Cl 15 mM como sustratos. Inmediatamente, las células se resuspendieron con Max Bacterial Enhancement Reagent (Invitrogen, U.S.A.) precalentado ($95^\circ C$) y se incubaron por 5 min. A continuación, se siguieron las instrucciones del fabricante hasta el paso de separación de fases. Se añadió un volumen igual de etanol al 100% a la fase acuosa y se llevó a cabo la purificación del ARN utilizando el kit de

purificación de ARN Direct-zol RNA Purification Kit (Zymo, U.S.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se llevó a cabo un tratamiento adicional con ADNasa utilizando el gDNA Removal Kit (Jena Bioscience). La cuantificación y la integridad del ARN aislado se evaluaron en un espectrofotómetro Biodrop μ Lite (Montreal Biotech, Canadá) y mediante electroforesis en agarosa, respectivamente. La ausencia de contaminación por gADN en las fracciones de ARN se probó mediante PCRs en las que no se observaron amplificaciones. Los ensayos de RT-qPCR se realizaron utilizando el SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen) en un sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usaron 100 ng de ARN en cada reacción y cebadores específicos para el gen *PapauC* (5'-ACACCCAGCAGATGAACAC-3' y 5'-GTAGGTGCCACCAGTTTCTT-3'). La expresión relativa de *PapauC* se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando la condición de crecimiento Gluc 20 mM más NH_4Cl 15 mM como referencia y el transcrito de proteína ribosómica 50S L21 (*rpIU*; PA4568) como control endógeno. Los cebadores usados para *rpIU* fueron 5'-ACAAGGTCCGCATCATCAA-3' y 5'-GAATGCCGGTGATCTTGATTTC-3'.

V.12. Acoplamiento molecular de diferentes aldehídos en el sitio activo de *PaPauC*

Estos estudios se llevaron a cabo con la colaboración del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

V.12.1. Cálculos mecano-cuánticos de los ligandos y simulaciones de acoplamiento molecular

Las estructuras de ligando se predijeron mediante análisis conformacional usando el campo de fuerza MMFF94 y el paquete para Química Cuántica computacional Gaussian 16 (Frisch *et al.*, 2016) con el nivel de teoría DFT BLYP3/6-31G (d), en el vacío. El acoplamiento molecular se realizó utilizando Autodock VINA (Trott y Olson, 2010) y la subunidad B de la estructura cristalográfica de *PaPauC* (PDB 6B4R) que tiene la cisteína catalítica en su forma reducida. Se utilizaron dos cajas de acoplamiento, una que comprendía solo el sitio activo y otra expandida 7 Å en los ejes *x*, *y* y *z*. El ligando se mantuvo flexible y la proteína rígida a excepción de las cadenas laterales de los residuos F169, W176, F296, T303 y D459. En cada caja se ejecutaron 26 rondas de acoplamiento y todas las poses resultantes (alrededor de 260) se analizaron utilizando VMD (Humphrey *et al.*, 1996) aprovechando sus herramientas complementarias para agrupamiento y su intérprete de comandos programable. El agrupamiento de poses se basó en su puntuación de energía y RMSD global, así como en las distancias entre el carbono carbonilo del ligando aldehído y los nitrógenos amídicos de la cadena principal de la cisteína catalítica, C302, y de la cadena lateral de la asparagina catalítica, N168.

VI. RESULTADOS

Capítulo I

Importancia de la enzima PaPauC en el catabolismo y toxicidad de las poliaminas en *P. aeruginosa*

VI.1. La enzima recombinante PaPauC oxida a APAL, GluAPAL, ABAL y GluABAL con diferente eficiencia

Con el fin de evaluar si la enzima PaPauC tiene actividad con los ω -aminoaldehídos que se han propuesto se forman en las rutas de degradación de Spm, Spd, Dap o Put en *P. aeruginosa*—APAL ABAL y los glutamil- ω -aminoaldehídos GluAPAL y GluABAL— investigamos la especificidad de la enzima PaPauC recombinante pura y su eficiencia catalítica usando una concentración fija de 0.6 mM de NAD⁺, que es cercana a la concentración fisiológica reportada en bacterias (Zhou *et al.*, 2011). Se usó NAD⁺ como coenzima ya que PaPauC no usa NADP⁺ (Cardona-Cardona, 2017). GluAPAL y GluABAL han sido propuestos por análisis transcriptómicos como los principales aldehídos intermediarios del catabolismo de poliaminas (Yao *et al.*, 2011), pero no están disponibles comercialmente, por lo que se llevó a cabo su síntesis. Hasta donde sabemos, a la fecha su síntesis no ha sido reportada y por lo tanto no han sido usados como sustratos de alguna enzima ALDH. La caracterización cinética de la enzima recombinante es necesaria porque evita la posible contaminación con otras enzimas ALDH que pueden estar presentes en extractos celulares crudos.

Como era de esperarse, la enzima recombinante PaPauC oxida APAL, ABAL GluAPAL y GluABAL, pero con importantes diferencias en la eficiencia catalítica. La

cinética de saturación de estos aldehídos se muestra en la Fig. 7, y los parámetros cinéticos estimados se dan en la Tabla 2.

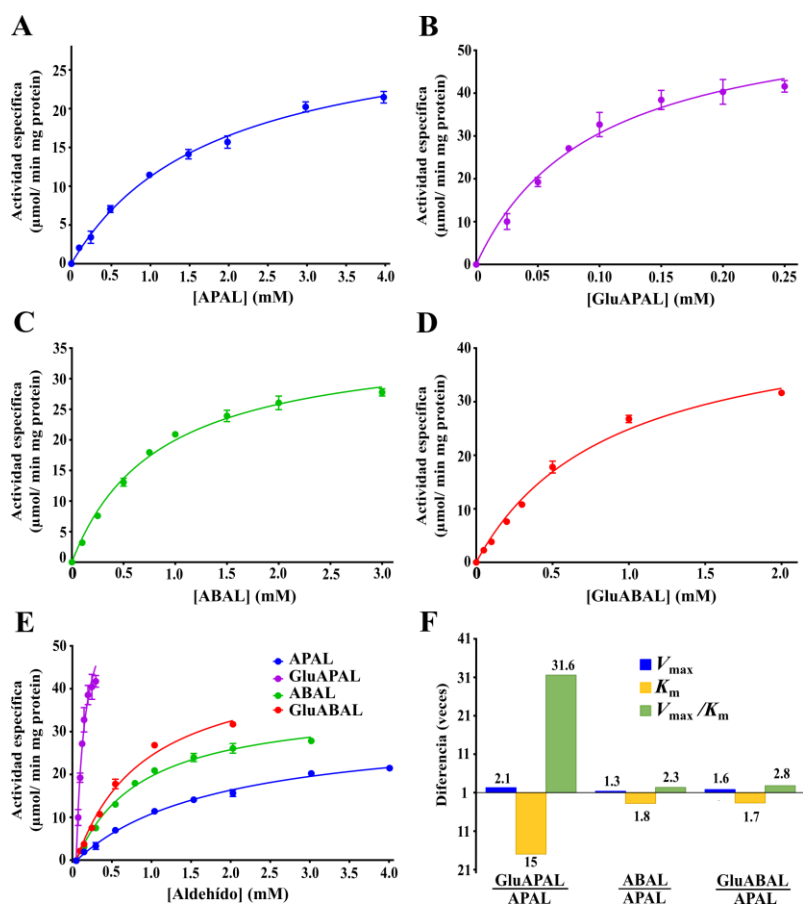


Fig. 7. Cinética de saturación de la enzima *PaPauC* recombinante con ω -aminoaldehídos y glutamil- ω -aminoaldehídos. Las velocidades iniciales se obtuvieron a 30 °C, pH 8.0 y NAD⁺ 0.6 mM. Los puntos son el promedio de los resultados de al menos dos experimentos independientes. Las barras verticales en cada punto indican la desviación estándar de estos promedios. Las curvas son las calculadas mediante el ajuste por regresión no lineal de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1). **(A)-(D)** Curvas de saturación con los aldehídos indicados en cada panel. **(E)** Comparación de las curvas de saturación de los cuatro aldehídos probados. Nótese que el intervalo de concentración de aldehído utilizado en la cinética de saturación difiere según la afinidad de la enzima por cada uno de los aldehídos ensayados. **(F)** Relación de los parámetros cinéticos de GluAPAL, ABAL y GluABAL a los de APAL.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de *PaPauC* usando ω -aminoaldehídos libres y glutamilados como sustratos variables. Los parámetros cinéticos se estimaron mediante ajustes de regresión no lineal de los datos experimentales mostrados en la Fig. 7. El símbolo \pm indica la desviación estándar de los valores estimados. U = $\mu\text{mol NADH formado/min}$.

Parámetro cinético	Aldehído			
	APAL	GluAPAL	ABAL	GluABAL
V_{\max} (U mg prot. ⁻¹)	29 \pm 1	60 \pm 4	37 \pm 1	47 \pm 2
K_m (mM)	1.50 \pm 0.10	0.10 \pm 0.01	0.84 \pm 0.06	0.89 \pm 0.07
V_{\max}/K_m (U mM ⁻¹ mg prot. ⁻¹)	19 \pm 1	600 \pm 70	44 \pm 3	53 \pm 5

Desde un punto de vista fisiológico, el resultado más relevante es la gran diferencia en la cinética de saturación de *PaPauC* con APAL y GluAPAL, siendo GluAPAL el mejor sustrato y APAL el peor. De hecho, de todos los aldehídos probados, APAL tiene la V_{\max} más baja, la K_m más alta y la V_{\max}/K_m más baja (Tabla 2 y Fig. 7). Tanto APAL como GluAPAL se forman durante la degradación de Spd, Spm y Dap (Yao *et al*, 2011; Chou *et al*, 2013), pero GluAPAL se oxidaría a una velocidad 30 veces mayor que APAL si ambos estuvieran en la misma concentración, como lo indica la relación de sus respectivos valores de V_{\max}/K_m (Fig. 7F). *In vivo*, esta diferencia sería considerablemente mayor si GluAPAL se forma en una proporción mayor que APAL, como es probable que ocurra, ya que se ha reportado que las formas glutamiladas de Spm y Spd se degradan preferentemente a sus formas libres. De hecho, Yao *et al*. (2011) propusieron que solo la vía de glutamilación está involucrada en la degradación de poliaminas. Sin embargo, nuestros resultados descritos a continuación apoyan que sí tiene lugar la degradación de las poliaminas libres, y por tanto la formación de

APAL en la degradación de Spm, Spd y Dap, con importantes implicaciones para la viabilidad de las células. Además, *in vivo* la oxidación de APAL por PaPauC se vería disminuida, aunque en menor grado, si Put se degradara al mismo tiempo que Spm, Spd o Dap. Esto último debido a la competencia del APAL con el ABAL y el GluABAL formados en la degradación de Put, ya que ambos aldehídos tienen valores de V_{max}/K_m más de dos veces superiores a los de APAL (Fig. 7F y Tabla 2). Lo mismo ocurriría si se degradara la Agm, dado que produce Put (Haas *et al*, 1984). Por lo tanto, es muy probable que el APAL formado en las células de *P. aeruginosa* como intermediario de las rutas de degradación de Spm, Spd y Dap, sea poco oxidado por PaPauC, y que las concentraciones intracelulares de APAL se acumulen si estas poliaminas se degradan activamente, como puede ocurrir durante la infección.

VI.2. Confirmación de que la actividad de PaPauC es crítica para el crecimiento de células de *P. aeruginosa* en poliaminas

Como primer paso, se crecieron células de *P. aeruginosa* en las diferentes poliaminas y puesto que los medios naturales en los que puede crecer *P. aeruginosa* (tejidos humanos, por ejemplo) contienen otras fuentes de carbono y nitrógeno además de las poliaminas, nos interesó también estudiar cómo la presencia de estos otros compuestos afectaba el crecimiento en poliaminas, o viceversa, como la presencia de poliaminas afectaba el crecimiento en otras fuentes de carbono. En nuestros experimentos usamos glucosa como fuente alternativa de carbono y NH₄Cl como fuente alternativa de nitrógeno

Por otra parte, para comprobar el papel crítico que juega la actividad de PaPauC en el catabolismo de las poliaminas, se hicieron crecimientos con la cepa mutante *pauC::ISlacZ*

que tiene el transposón IS*lacZ/hah* insertado en el gen *PapauC* (Fig. 8A), como se reportó (Jacobs *et al.*, 2003). El transposón IS*lacZ/hah* (6.16 Kb) se deriva del elemento IS50L del transposón Tn5 y genera fusiones de genes traducionales de β -galactosidasa (*lacZ*) si se insertan adecuadamente en un gen objetivo. Se espera que un promotor de neomicina fosfotransferasa orientado hacia el exterior reduzca los efectos polares en la expresión génica aguas abajo para las inserciones orientadas adecuadamente. La recombinación mediada por Cre elimina secuencias situadas entre los sitios *loxP* en cada transposón, dejando una inserción de 63 codones que codifica un epítipo de influenza-hemaglutinina y una etiqueta de purificación de metalafinidad de hexahistidina (en conjunto denominadas "hah"). Además, contiene un determinante de resistencia a tetraciclina.

Previamente, la inserción del transposón en la cepa mutante se comprobó mediante PCR, como se describió en la sección de Métodos. Los productos de estos experimentos de PCR analizados mediante electroforesis en gel de agarosa y mostrados en la Fig. 8B indican la amplificación de solo la parte inicial del gen *PapauC* interrumpido por el transposón IS*lacZ/hah* (banda en el gel de agarosa de aproximadamente 371 pb) y la amplificación completa del gen *PapauC* que no ha sido interrumpido (banda de aproximadamente 1,500 pb). Es decir, el gen *PapauC* intacto está ausente en la cepa mutante, que no mostró la banda correspondiente a este gen observado en la cepa silvestre (Fig. 8B). La ubicación y organización del gen *PapauC* en el genoma de *P. aeruginosa* indica que esta inserción no tiene efectos polares sobre los genes vecinos. Por lo tanto, las características fenotípicas de la mutante *PapauC::ISlacZ* que describimos a continuación se pueden atribuir sólo a que porta el gen *pauC* defectuoso.

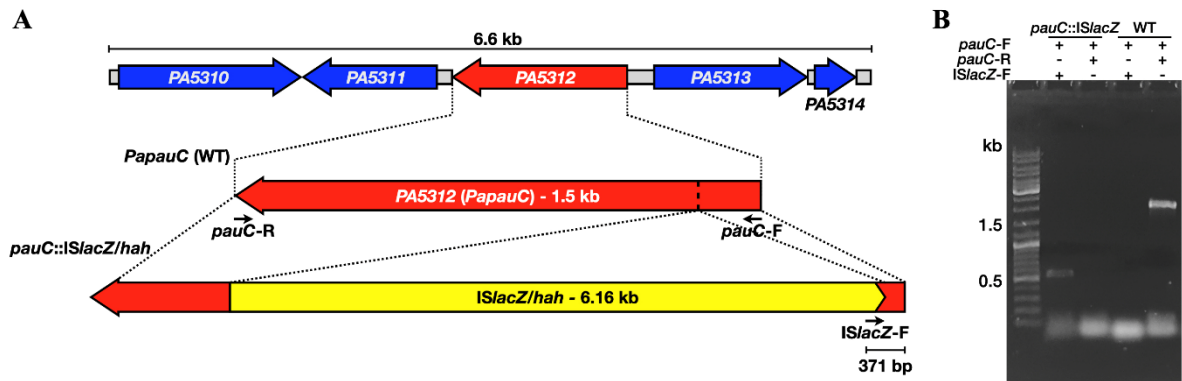


Fig. 8. Confirmación de la inserción del transposón ISlacZ/hah en la cepa mutante *pauC::ISlacZ*. (A) Representación esquemática del sitio de inserción del transposón ISlacZ/hah (6.16 kb) dentro de la secuencia codificante de *PapauC* (1.5 kb) que da como resultado la mutante *pauC::ISlacZ/hah*. Se muestra que la región genómica de la cepa de tipo silvestre (6.6 kb) donde se encuentran PA5312 (*PapauC*) y cuatro genes vecinos indica la falta de efectos polares de la inserción del transposón en *PapauC* en sus genes vecinos. Las regiones intergénicas se representan como cajas grises. (B) Análisis de electroforesis en agarosa (teñido con GelRed) de los productos de amplificación por PCR utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos (oligonucleótidos específicos de *PapauC*: *pauC-F* y *pauC-R*; oligonucleótido ISlacZ/hah::ISlacZ-F) y gDNA de *pauC::ISlacZ* o MPAO1 (WT) cepas como moldes. El sitio de alineamiento de cada oligonucleótido se indica en (A) así como el tamaño esperado del producto de amplificación.

A las concentraciones utilizadas, todas las poliaminas sustentaron el crecimiento de células de *P. aeruginosa* MPAO1 como únicas fuentes de carbono y nitrógeno (Fig. 9 y Tabla 3), lo que confirma resultados previos de otros laboratorios (Jann *et al.*, 1988; Chou *et al.*, 2008-2013). Put y Cad se utilizaron a 20 mM porque concentraciones más altas son fisiológicamente improbables, mientras que Spd y Dap se usaron a 5 mM y Spm a 0.5 mM porque concentraciones más altas de estas tres poliaminas inhibieron el crecimiento de las células, lo que es consistente con su citotoxicidad conocida (Pegg, 2013). El crecimiento de las células silvestres en presencia de 5 mM Gluc más 0.5 mM Spm o 5 mM Dap fue prácticamente igual que en células crecidas en solo 5 mM Gluc, pero mayor que el de las células crecidas en solo las poliaminas. En el caso de Spd se observó incluso un crecimiento

incrementado de estas células en el medio que contenía a Gluc más la poliamina, comparado tanto con el crecimiento en solo la poliamina como con el crecimiento solo en glucosa, lo que indica que Spd a esta concentración está contribuyendo al crecimiento a la menor concentración de Gluc en el medio (5 mM versus 20 mM en los medios en los que se añadieron Put o Cad). El crecimiento en 20 mM Put o 20 mM Cad en presencia de 20 mM Gluc fue similar al crecimiento en ausencia de Gluc y al crecimiento en 20 mM Gluc. Como era de esperarse, la cepa mutante *pauC::ISlacZ* desprovista del gen *PapauC* funcional no pudo crecer en ninguna de las poliaminas como únicas fuentes de carbono y nitrógeno (Tabla 3), lo que confirma reportes previos de que la actividad *PaPauC* es esencial para la degradación de las poliaminas (Jann *et al.*, 1988; Chou *et al.*, 2008-2013). Nótese que el crecimiento de esta cepa en glucosa es prácticamente igual que el de la cepa silvestre.

Tabla 3. Efecto de las poliaminas sobre la actividad de *PaPauC* medida en extractos crudos de células de *P. aeruginosa* crecidas en poliaminas o en poliaminas más glucosa y NH₄Cl

Las actividades específicas se determinaron a 30 °C, en un amortiguador de fosfatos de potasio pH 8,0, ABAL 1 mM o APAL 1 mM y NAD⁺ 0.6 mM. mU = nmol NADH formado/min. Las células silvestres y mutantes *pauC::ISlacZ* se cultivaron durante 24 h en los sustratos y concentraciones indicados. Los datos son el promedio ± la desviación estándar de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes. N.D., no determinado; N.C., no hubo crecimiento.

Sustratos de crecimiento	Cepa WT			Cepa <i>pauC::ISlacZ</i>		
	Crec. de células (DO ₆₀₀)	Act. específica (mU mg prot ⁻¹)		Crec. de células (OD ₆₀₀)	Act. específica (mU mg prot ⁻¹)	
		ABAL	APAL		ABAL	APAL
20 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	1.01 ± 0.05	25 ± 4	22 ± 5	1.02 ± 0.02	12.5 ± 0.7	7.8 ± 0.2
5 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.52 ± 0.02	16 ± 5	N.D.	0.52 ± 0,02	N.D.	N.D.
20 mM Put	0.79 ± 0.03	128 ± 12	56 ± 9	N.C.		
20 mM Put + 20 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.82 ± 0.04	88 ± 7	42 ± 6	0.79 ± 0,03	5.5 ± 3.5	1.8 ± 1.1
20 mM Cad	0.77 ± 0.06	98 ± 7	55 ± 4	N.C.		
20 mM Cad + 20 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.78 ± 0.02	38 ± 10	35 ± 1	0.80 ± 0,03	9.5 ± 3.5	N.D.
0.5 mM Spm	0.11 ± 0.01	77 ± 8	40 ± 11	N.G.		
0.5 mM Spm + 5 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.50 ± 0.04	60 ± 2	40 ± 4	0.18 ± 0,02	0.20 ± 0.14	0.1 ± 0.1
5 mM Spd	0.61 ± 0.03	184 ± 12	70 ± 13	N.C.		
5 mM Spd + 5 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.81 ± 0.07	71 ± 7	34 ± 12	0.13 ± 0,02	2.1 ± 0.2	3.2 ± 1.3
5 mM Dap	0.22 ± 0.05	67 ± 17	42 ± 8	N.C.		
5 mM Dap + 5 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.45 ± 0.10	65 ± 17	48 ± 4	0.08 ± 0,01	3.6 ± 0.2	N.D.

En la cepa mutante *pauC::ISlacZ* también se observaron crecimientos en Gluc más alguna de estas poliaminas similares a los observados en solo Gluc. Pero de forma muy interesante, en las células mutantes *pauC::ISlacZ* la presencia de Spm, Spd o Dap en el medio de cultivo que contenía glucosa disminuyó significativamente el crecimiento con respecto a los medios que sólo contenían glucosa. Estos últimos resultados indican que la toxicidad de estas poliaminas se incrementa en ausencia de la actividad *PaPauC* y muestran el papel crítico que tiene *PaPauC* en la prevención de esta toxicidad, probablemente oxidando un aminoaldehído tóxico formado en su degradación. Como se mostró en la Fig. 1, las rutas de degradación de estas tres poliaminas tóxicas comparten la formación de APAL y GluAPAL, aldehídos que no se forman en la degradación de Put o Cad, lo que es consistente con que ninguna de ellas tiene un efecto negativo sobre el crecimiento celular incluso cuando se agregan a una concentración alta. De estos dos aldehídos, el APAL es probablemente el tóxico, dada su probada toxicidad para otras células (Sharmin *et al.*, 2001; Ivanova *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2007).

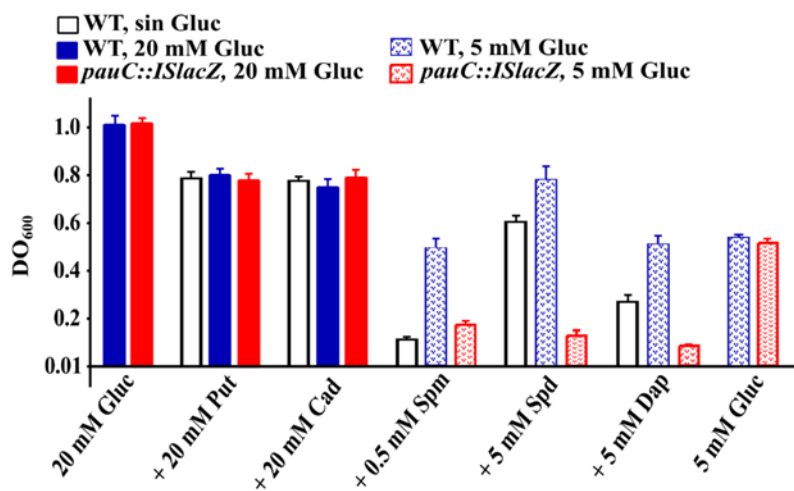


Fig. 9. Crecimiento de células de *P. aeruginosa* en poliaminas. Las barras representan el valor promedio, con su desviación estándar, del crecimiento observado en al menos dos experimentos diferentes. Las células de la cepa silvestre y de cepa mutante *pauC::ISlacZ* se cultivaron durante 24 h a 37 ° C y 200 rpm en un medio mínimo M9 suplementado con los sustratos de crecimiento indicados.

VI.3. La actividad de *PaPauC* y la expresión del gen *PapauC* aumentan en células de *P. aeruginosa* crecidas en poliaminas

Para evaluar la capacidad *in vivo* de *PaPauC* para oxidar los diferentes aminoaldehídos libres o glutamilados formados durante la degradación de poliaminas, investigamos la actividad *PaPauC* en extractos crudos de células de *P. aeruginosa* cultivadas en poliaminas como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, o en poliaminas más glucosa (Gluc) y NH₄Cl como fuentes adicionales de carbono y nitrógeno. En estos experimentos usamos ABAL 1 mM o APAL 1 mM como sustratos y los resultados se muestran en la Fig. 10 y Tabla 3.

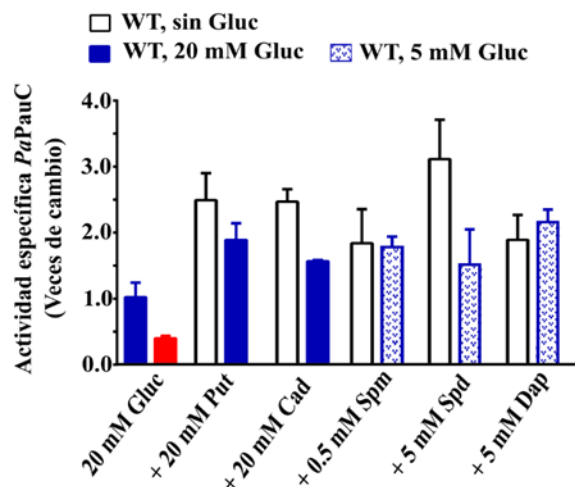


Fig. 10. Actividad específica de *PaPauC* en extractos crudos de las células silvestres de *P. aeruginosa* cultivadas en poliaminas en ausencia o presencia de glucosa. Las condiciones generales de crecimiento fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 9. La actividad enzimática se determinó a 30 °C, pH 8,0, APAL 1 mM y NAD⁺ 0.6 mM. Se muestra

el valor promedio \pm desviación estándar de las veces de aumento de la actividad específica con respecto a la observada en células cultivadas en Gluc 20 o 5 mM más NH_4Cl 15 mM. Los datos se obtuvieron en al menos dos experimentos diferentes.

Cuando las células se cultivaron solo en Gluc 20 o 5 mM más NH_4Cl 15 mM, la actividad ALDH con ABAL o APAL fue muy pequeña, lo que sugiere una baja expresión basal del gen *PapauC*, o una expresión nula de este gen y la presencia de otra(s) ALDH(s) con baja actividad hacia estos aldehídos. La actividad ALDH aumentó significativamente en células cultivadas en poliaminas como única fuente de carbono y nitrógeno de acuerdo con lo reportado previamente de la inducción del gen *PapauC* por Agm, Put o Spd (Chou *et al.*, 2008; Yao *et al.*, 2011). Basándonos en el pequeño aumento de la actividad ALDH en células cultivadas en presencia de Dap, pensamos que también esta poliamina provoca la inducción del gen *PapauC*. Sin embargo, no podemos afirmar nada en el caso de Spm, porque su baja concentración, 0.5 mM, en el medio de cultivo soporta muy poco crecimiento bacteriano, por lo que los resultados con esta poliamina no son concluyentes.

Para evaluar el efecto que pudiera tener la presencia de otras fuentes de carbono y nitrógeno, que probablemente estén en los sitios de infección, sobre los aumentos inducidos por poliaminas en la actividad de *PaPauC* *in vivo*, medimos esta actividad en extractos crudos de células cultivadas en poliaminas más Gluc, a la misma concentración que la poliamina, más NH_4Cl 15 mM. Los aumentos provocados por poliaminas en la actividad ALDH con APAL y ABAL fueron menores que en ausencia de Gluc, aunque aún mayores que los determinados en células cultivadas solo en Gluc más amonio (Fig. 10 y Tabla 3). Esto sugiere que la expresión de *PapauC* está sujeta a represión catabólica por Gluc y presumiblemente también por otras fuentes de carbono que la bacteria pueda encontrar en los sitios de infección. Además, cuando las células mutantes *pauC::ISlacZ* se cultivaron en un medio con

Gluc más amonio suplementado con cualquiera de las diferentes poliaminas, no se observaron aumentos en la actividad ALDH de los extractos crudos (Tabla 3). Este hallazgo apoya firmemente que los aumentos en la actividad ALDH observados en las células silvestres crecidas en poliaminas se deben a aumentos en la actividad *PaPauC*.

Para confirmar la inducción del gen *PapauC* por poliaminas y la represión catabólica por Gluc, evaluamos su expresión relativa en diferentes condiciones nutricionales mediante ensayos de RT-qPCR (Fig. 11). Encontramos que la expresión relativa de *PapauC* aumenta cuando las células se cultivan en Put y Spd, como ya se había reportado por otros (Yao *et al.*, 2011). También encontramos aumentos, aunque menores, en las células cultivadas en Spm (incluso a la baja concentración de esta poliamina a la que se cultivaron las células) o Dap. La presencia de Gluc 20 mM en los medios que contienen poliaminas ejerció una importante represión de la transcripción del gen *PapauC*—menos de nuevo en el caso de Spm probablemente por las razones mencionadas arriba—, lo que explica los resultados de la actividad enzimática en los extractos crudos descritos anteriormente. En el caso de las células cultivadas en Dap, la expresión de *PapauC* parece no estar reprimida significativamente por la glucosa, también de acuerdo con los resultados de la actividad enzimática mostrados en la Fig. 10.

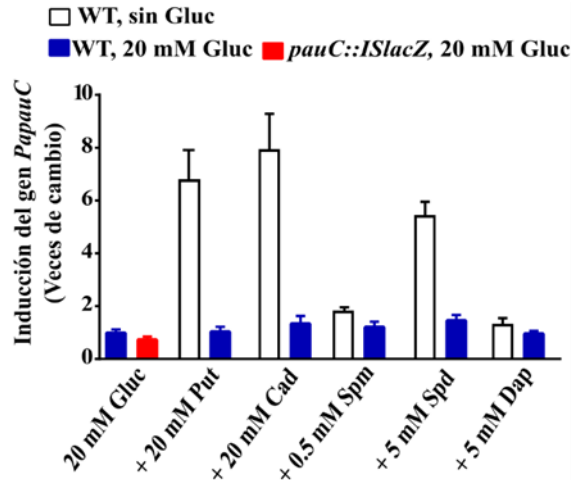


Fig. 11. Expresión del gen *PapauC* en células de *P. aeruginosa* cultivadas en poliaminas en ausencia o presencia de glucosa. Las condiciones generales de crecimiento fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 9, pero la concentración de Gluc fue 20 mM. Como control negativo, se determinó la expresión del gen de la cepa mutante en células cultivadas en glucosa más amonio. Los niveles relativos del transcrito del gen *PapauC* se determinaron mediante RT-qPCR. Se muestra el valor promedio \pm desviación estándar de las veces de cambio en los niveles del transcrito en las distintas condiciones de crecimiento con respecto al crecimiento en Gluc. Los datos se obtuvieron en al menos tres experimentos diferentes.

VI.4. La toxicidad de Spm, Spd o Dap se correlaciona con los niveles de actividad de *PaPauC*

En vista del hallazgo de la represión catabólica sobre el gen *PapauC* ejercida por Gluc, exploramos la toxicidad de Spm y Spd para las células de *P. aeruginosa* silvestre mediante la adición de diferentes concentraciones de estas poliaminas a medios de cultivo que contienen Gluc 20 mM—una concentración 4 veces mayor que la que usamos en los experimentos descritos anteriormente y cuyos resultados fueron mostrados en la Fig. 9—con el fin de simular un medio de nutrientes más rico, que las bacterias pueden encontrar en los sitios de infección. Encontramos que en estas condiciones la Spm a una concentración 2.5 mM no era tóxica para las células silvestres ni para las células mutantes *pauC::ISlacZ*

(Fig.12A), mientras que la Spm a solo 0.5 mM era altamente tóxica para estas células cuando crecían en un medio que contenía Gluc 5 mM (Fig. 9). Estos resultados sugieren que la alta concentración de Gluc produjo un mayor grado de represión catabólica de otras enzimas de las rutas degradativas de las poliaminas que el producido por Gluc 5 mM, disminuyendo así de manera importante la formación del aldehído tóxico intermediario en estas rutas. El aldehído que se forme parece ser oxidado por la baja actividad de una ALDH diferente a *PaPauC* que estaría presente tanto en las células silvestres como en las células mutantes. El mismo razonamiento explica la falta de toxicidad de Spd 2.5 mM observada en ambos tipos de células en presencia de Gluc 20 mM. Pero a medida que aumenta la concentración de la poliamina en el medio de crecimiento, la represión catabólica es parcialmente aliviada por ella y al mismo tiempo se aumenta su grado de degradación, de modo que la formación del aldehído tóxico será mayor. La actividad de *PaPauC* probablemente sea más alta a concentraciones de poliamina altas que a concentraciones bajas, pero esta formación del aldehído tóxico aún será más baja que en las mismas concentraciones de poliamina en presencia de Gluc 5 mM. Por lo tanto, si el aldehído tóxico formado es APAL, la baja actividad de *PaPauC* junto con la baja eficiencia catalítica de *PaPauC* hacia APAL—particularmente en presencia del GluAPAL que se estaría produciendo—conducirá a la acumulación de APAL hasta concentraciones tóxicas, no solo para las células mutantes sino también para las células silvestres. Consistente con esto, con una concentración de Spm 5 mM los niveles del aldehído tóxico intermediario parece que alcanzaron una concentración tal que abolió el crecimiento no solo de la mutante desprovista de *PaPauC* sino también de la cepa silvestre, en las que la actividad de *PaPauC* claramente no es suficiente para oxidar el APAL formado. Esta explicación también es coherente con el hallazgo de que la Spd 5 mM era tóxica para la cepa silvestre cultivada en Gluc 20 mM (Fig. 12A), mientras que la

Spd 5 mM incluso promovía el crecimiento en presencia de Gluc 5 mM. Por lo tanto, un medio más rico en nutrientes (ejemplificado por una alta concentración de Gluc) protegería contra la toxicidad de bajas concentraciones de Spm o Spd, pero aumentaría la susceptibilidad de las células, particularmente de aquellas con una actividad *PaPauC* inhibida o ausente, a la toxicidad de estas poliaminas.

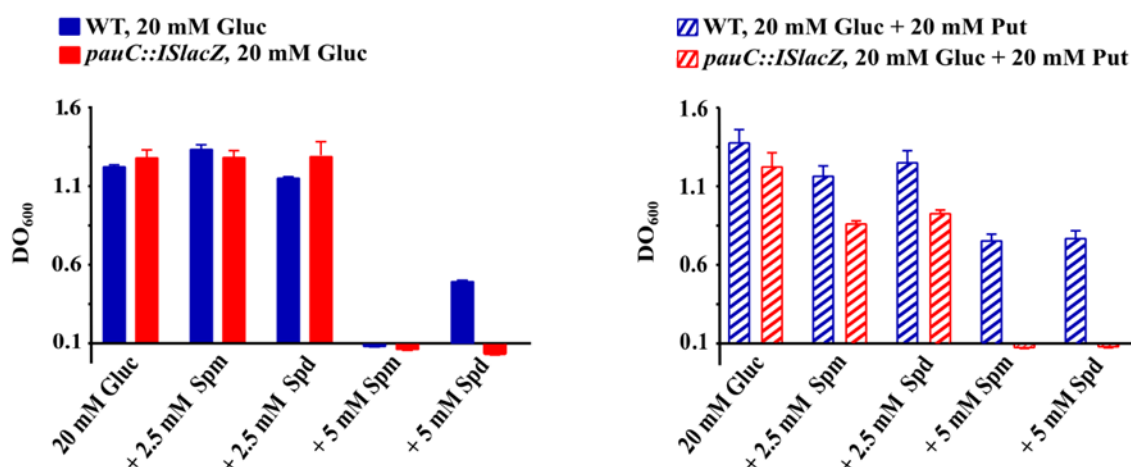


Fig. 12. Efectos de Spm y Spd sobre el crecimiento de células silvestres de *P. aeruginosa* y de la mutante *pauC::ISlacZ* en alta concentración de Gluc en ausencia (A) o presencia de Put (B). Las condiciones de crecimiento fueron las descritas en la leyenda de la Fig. 9, pero la concentración de Gluc fue 20 mM. Se muestra el valor promedio \pm desviación estándar de las veces de aumento de la actividad específica con respecto a la observada en células cultivadas en Gluc 20 más NH₄Cl 15 mM. Los datos se obtuvieron en al menos dos experimentos diferentes.

Si la mayor toxicidad de Spm y Spd en un medio de cultivo más rico se debe a la represión catabólica del gen *PapauC* que da como resultado una menor actividad de *PaPauC*, se esperaría que una poliamina no tóxica como Put redujera los efectos tóxicos de estas dos poliaminas en las células silvestres cuando hay una alta concentración de Gluc. Se sabe que Put induce otros genes implicados en la degradación de Spd (Yao *et al*, 2011) y en este trabajo mostramos que a 20 mM produce un aumento significativo de la actividad de *PaPauC* en

presencia de Gluc 20 mM (Fig. 9 y Tabla 3). Debido a esta inducción de las rutas de degradación de poliaminas por Put, se producirá más APAL en la degradación de Spm y Spd, pero al mismo tiempo el aumento inducido por Put en la actividad de *PaPauC* permitirá la oxidación de una mayor proporción del APAL formado, incluso considerando la competencia por *PaPauC* de ABAL y GluABAL producidos a partir de Put. Por el contrario, la presencia de Put incluso aumentaría la toxicidad de Spm y Spd para las células mutantes, que tendrán niveles aumentados de APAL y ninguna actividad de *PaPauC*, ampliando así la diferencia en la sensibilidad de ambas cepas a estas poliaminas (Fig. 11B). A 2.5 mM de Spm o 2.5 mM de Spd se observó inhibición del crecimiento en las células mutantes en presencia de Put, mientras que no se observó inhibición en su ausencia. A 5 mM Spm o 5 mM Spd, el efecto inhibitorio de estas poliaminas sobre el crecimiento de las células silvestre fue mucho menor que el observado a las mismas concentraciones, pero en ausencia de Put, lo que sugiere que, como se esperaba, el aumento producido por Put en la actividad de *PaPauC* está contrarrestando parcialmente las altas concentraciones de APAL. Pero, aun así, los efectos tóxicos de Spd 5 mM fueron más altos que los observados en el medio con Gluc 5 mM, consistente con niveles más altos de APAL en el estado estacionario. Las concentraciones de APAL formadas en estas condiciones, es decir, alta concentración de Gluc, concentraciones moderadas de Spm o Spd y alta concentración de Put, inhibieron completamente el crecimiento de las células mutantes. Por lo tanto, la inhibición de *PaPauC* resultará en un aumento de la toxicidad de Spm y Spd en las células de *P. aeruginosa* incluso si la bacteria está creciendo en un medio rico en nutrientes y en presencia de Put, la poliamina más común y abundante en los tejidos humanos (Teti *et al*, 2002; Grasemann *et al*, 2012; Maráková *et al*, 2020).

VI.5. APAL, pero no GluAPAL, es altamente tóxico para las células de *P. aeruginosa*

Para proporcionar evidencia adicional que respalde nuestra hipótesis de que los efectos tóxicos de Spd, Spm y Dap se deben principalmente al APAL formado en su degradación, investigamos si las células silvestres de *P. aeruginosa* podían crecer en APAL o GluAPAL. Con fines comparativos, también probamos como sustratos de crecimiento ABAL y GluABAL formados en la degradación de Put.

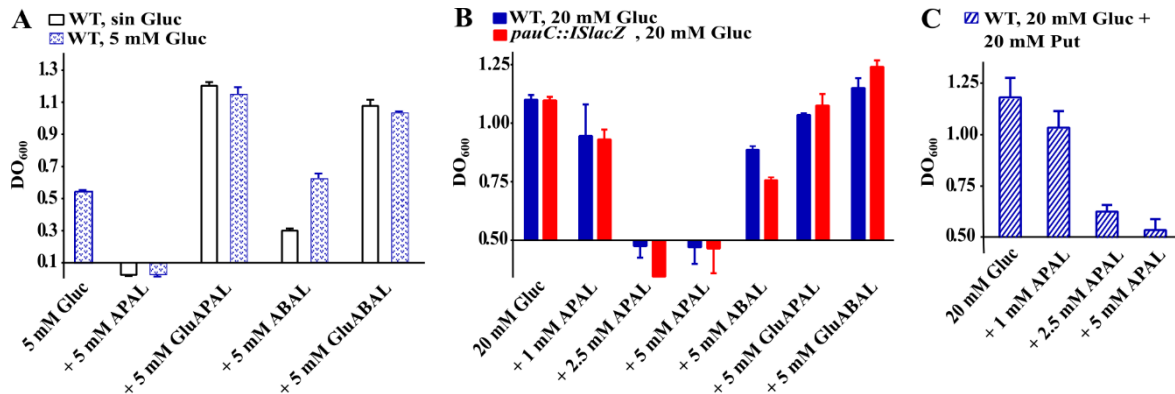


Fig. 13. Crecimiento de células de *P. aeruginosa* en ω -aminoaldehídos libres y glutamilados y efectos de estos aldehídos sobre el crecimiento en glucosa. (A) Se cultivaron las células silvestres durante 24 h a 37 °C y 200 rpm en los aldehídos indicados en ausencia o presencia de glucosa 5 mM más NH₄Cl 15 mM. **(B)** Efecto de estos aldehídos sobre el crecimiento de las células silvestres y mutantes *pauC::ISlacZ* en Gluc 20 mM más NH₄Cl 15 mM. Los aldehídos se añadieron al medio después de que alcanzó una D.O. de 0.5 y luego las células se incubaron durante 16 h más. **(C)** Efectos de APAL sobre el crecimiento de las células silvestres en Gluc 20 mM más NH₄Cl 15 mM más Put 20 mM y, lo demás, las mismas condiciones que en (B). Las barras son el valor medio de al menos dos determinaciones experimentales diferentes y las líneas verticales indican la desviación estándar media.

Cuando cada uno de estos aminoaldehídos se utilizó como única fuente de carbono y nitrógeno, las células silvestres crecieron muy bien en presencia de GluAPAL 5 mM o

GluABAL 5 mM, incluso mejor que en Gluc 5 mM, y menos bien en ABAL (Fig. 13A). Además, cuando los medios de crecimiento que contenían Gluc 5 mM más NH_4Cl 15 mM se suplementaron con ABAL, GluAPAL o GluABAL, ninguno de ellos inhibió el crecimiento celular; incluso en el caso de ABAL, las células crecieron mejor que en ausencia de este aldehído. Estos resultados indican que estos tres aldehídos no solo pueden favorecer el crecimiento de las células, sino también que ninguno de ellos es tóxico a las concentraciones utilizadas en estos experimentos, que probablemente son mucho más altas que sus concentraciones de estado estacionario durante la degradación fisiológica de poliaminas. Por el contrario, las células no crecieron en APAL 5 mM incluso cuando además de APAL estaba presente Gluc más amonio como fuentes de carbono y nitrógeno (Fig. 13A), lo que muestra claramente la toxicidad del APAL. Estos hallazgos apoyan firmemente nuestra propuesta de que el aldehído tóxico producido en la degradación de Spm, Spd y Dap es APAL, y son consistentes tanto con la toxicidad de estas tres poliaminas como con la falta de toxicidad de Put a la concentración utilizada en este estudio, que no forma este aldehído durante su degradación. Se ha reportado que altas concentraciones de Put, mayores a las usadas por nosotros, tienen un efecto negativo sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* (Krysenko *et al* 2017; del Rio *et al*, 2019; Wunderlichová *et al* 2014), pero probablemente ello se debe no a la toxicidad de los aldehídos que forma sino a que se produce una importante alteración en la concentración de poliaminas óptima para el buen funcionamiento de las células. Además, cabe señalar que, aunque en las células de *P. aeruginosa*, Put produce Spd en la reacción catalizada por la espermidina sintasa, esta reacción forma parte de la ruta de biosíntesis de Spd, no de la ruta de degradación de Put (Tabor y Tabor, 1985).

El que GluAPAL no afecte negativamente el crecimiento de células de *P. aeruginosa*, incluso de la cepa mutante, es consistente con la eliminación de la toxicidad de los aminoaldehídos por modificación química del grupo ω -amino (Kakegawa *et al.*, 1991; Wood *et al.*, 2007), ya sea por glutamilación, como ocurre en *P. aeruginosa* y otras bacterias (Yao *et al.*, 2011; Chou *et al.*, 2013, Kurihara *et al.*, 2005; Krysenko *et al.*, 2017), o por acetilación, como ocurre en otras células procariontas y eucariontas (Kakegawa *et al.*, 1991; Forouhar *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2019).

Curiosamente, aunque las células crecieron en ABAL, GluABAL o GluAPAL a 5 mM como las únicas fuentes de carbono y nitrógeno, estos aldehídos no pudieron inducir la expresión del gen *PapauC* según lo evaluado por la actividad específica de ALDH hacia ABAL y APAL medida en los extractos crudos de células cultivadas en estos aldehídos, que fue muy bajo y similar al medido en las células cultivadas en el medio Gluc 5 mM más amonio (resultados no mostrados). Por lo tanto, parece que el crecimiento en estos aldehídos como las únicas fuentes de carbono y nitrógeno se puede lograr con una baja actividad basal de *PaPauC*, o con la baja actividad de otra ALDH inespecífica, probablemente porque no son tóxicos o tienen una baja toxicidad, de modo que no tendrán ningún efecto negativo sobre el crecimiento, incluso si sus concentraciones en estado estacionario fueran altas debido a su presumiblemente baja velocidad de oxidación.

Basándonos en los resultados de crecimiento bacteriano en poliaminas y altas concentraciones de Gluc descritos anteriormente, para explorar más a fondo la toxicidad de APAL, investigamos el efecto de este aldehído sobre las células silvestres y mutantes *pauC::ISlacZ* que crecen en Gluc 20 mM más NH_4Cl 15 mM. Con fines comparativos, también estudiamos los efectos de GluAPAL, ABAL y GluABAL. Además, en estos

experimentos los aldehídos se añadieron después de que el cultivo había alcanzado una densidad óptica de 0.5, para conocer la susceptibilidad a estos aminoaldehídos cuando se añaden al medio de cultivo en la fase exponencial de crecimiento, no en la fase inicial de crecimiento como en los experimentos mostrados en la Fig. 13A. Luego, se midió el crecimiento celular después de un tiempo de incubación adicional de 16 h. Como se muestra en la Fig. 13B, APAL a 1 mM produjo una inhibición del crecimiento similar en ambos tipos de células, lo que indica que la mayor parte de la actividad ALDH hacia APAL presente en las células silvestres no se debe a *PaPauC*, que nuevamente parece estar disminuida de manera importante en la alta concentración de Gluc. Pareciera entonces que la actividad de otra ALDH presente en las células no es suficiente para oxidar completamente al APAL incluso a esta baja concentración. La presencia de APAL 2.5 mM o 5 mM parece no solo detener totalmente el crecimiento de las células silvestres y mutantes, sino también producir la muerte celular, como lo sugieren las densidades ópticas de los cultivos al final del experimento, que fueron menores que cuando se añadió el aldehído.

El hallazgo de que ABAL 5 mM produjo cierto grado de inhibición del crecimiento en las células silvestres, mientras que no se observó inhibición cuando se agregó al medio Gluc 5 mM, nuevamente indica la insuficiencia de la actividad ALDH de estas células y respalda nuestra conclusión anterior de que la actividad *PaPauC* es mucho menor en las células cultivadas en Gluc 20 mM que en las células cultivadas en Gluc 5 mM. Hay que tener en cuenta que, a diferencia de las poliaminas, ABAL no puede inducir un aumento en la actividad de *PaPauC* y, por lo tanto, en las células silvestres, esta actividad será la misma independientemente de la presencia o ausencia de ABAL en el medio de crecimiento. Comprensiblemente, la inhibición del crecimiento de ABAL fue mayor en las células

mutantes totalmente desprovistas de actividad *PaPauC*. Aun así, la toxicidad de ABAL fue mucho menor que la de APAL a la misma concentración, lo que es consistente con la mayor reactividad conocida de APAL hacia nucleófilos biológicos (Sharmin *et al*, 2001; Ivanova *et al*, 2002; Wood *et al*, 2007). Interesantemente, el crecimiento de las células mutantes y silvestres no fue inhibido en absoluto por GluAPAL 5 mM o GluABAL 5 mM, como habíamos observado en células cultivadas en Gluc 5 mM, lo que indica que la glutamilación en los grupos amino de estos ω -aminoaldehídos elimina su toxicidad. Estos resultados respaldan nuestra propuesta de que la toxicidad de Spm, Spd y Dap se debe principalmente a la formación de APAL durante su degradación.

Dado que los efectos inhibidores de APAL, y en menor grado de ABAL, fueron mayores en células cultivadas a una alta concentración de Gluc debido a la represión catabólica del gen *PapauC* (Fig 13A y 13B), razonamos que la presencia en los medios de cultivo de Put, una poliamina que no produce APAL en su degradación, sería de ayuda para aliviar los efectos tóxicos de APAL ya que los niveles de actividad de *PaPauC* aumentarían por esta poliamina. Por ello, exploramos los efectos que tiene sobre la toxicidad de APAL la suplementación del medio que contenía Gluc más amonio con Put 20 mM. Como esperábamos dados nuestros resultados cuando se agregaron Spm o Spd al medio de crecimiento en presencia de Put, el grado de inhibición del crecimiento por APAL 1 mM fue menor que en ausencia de Put. A APAL 2.5 mM y 5 mM, las células silvestres todavía experimentaron algo de crecimiento, aunque mucho menor que las células control a las que no se agregó APAL. Este efecto fue particularmente claro a APAL 5 mM que permitió un ligero crecimiento, en contraste con la muerte de las células observado en ausencia de Put (Fig. 13C). La menor toxicidad de APAL para las células silvestres en presencia de Put en

comparación con la observada en ausencia de poliamina podría explicarse por la inducción del gen *PapauC* por Put que conduce a una mayor actividad de *PaPauC*. Estos resultados refuerzan nuestra conclusión de que el grado de toxicidad de Spm, Spd, Dap y APAL depende de los niveles de actividad de *PaPauC* en las células.

VII. DISCUSIÓN

Capítulo I

Importancia de la enzima *PaPauC* en el catabolismo y toxicidad de las poliaminas en *P. aeruginosa*

VII.1. La formación de APAL es en gran parte responsable de la toxicidad de Spm, Spd y Dap para las células de *P. aeruginosa*

La toxicidad de Spm y Spd para una serie de células que van desde bacterias hasta mamíferos se conoce desde hace mucho tiempo y se explica por diferentes mecanismos (para una revisión ver Pegg, 2013), que brevemente pueden englobarse en dos: (i) unión a ácidos nucleicos, membranas o proteínas, interfiriendo con sus funciones y/o reemplazando cationes como el magnesio necesarios para estas funciones (Morris *et al*, 1991); (ii) generar en su catabolismo una variedad de compuestos potencialmente tóxicos (aldehídos que incluyen acroleína, APAL, Spm-aldehído, Spd-aldehído y especies reactivas de oxígeno) (Kimes y Morris, 1971; Sharmin *et al*, 2001; Ivanova *et al*, 2002; Wood *et al*, 2007; Pledgie *et al*, 2005). Pero a pesar de que estos mecanismos pueden participar en la toxicidad de Spm, Spd o Dap hasta cierto punto, nuestros hallazgos en el estudio del impacto de estas poliaminas en el crecimiento de las células de *P. aeruginosa* indican claramente que uno de los principales factores causantes de su toxicidad es la formación de APAL durante su degradación. De hecho, nuestros resultados sugieren que la toxicidad de estas poliaminas solo puede disminuir cuando se producen concentraciones muy bajas de APAL, ya sea por sus bajas concentraciones en los medios de cultivo o porque estas rutas de degradación de las poliaminas están altamente reprimidas en un medio rico en nutrientes.

Que la formación de APAL sea responsable de la toxicidad de estas tres poliaminas es consistente con que la toxicidad de Spm sea mayor que la de Spd o Dap, dado que de acuerdo con las rutas de degradación propuestas en *P. aeruginosa* (Fig. 1) Spm produce más APAL que Spd y Dap por molécula degradada. Una molécula de Spm libre podría producir dos moléculas de APAL, mientras que solo se formaría una molécula de APAL por molécula de Spd libre o Dap libre. La proporción de APAL formada a partir de estas poliaminas puede ser menor si una parte de ellas están glutamiladas, porque producirán la forma glutamilada de APAL (GluAPAL) que no es tóxica para las células de *P. aeruginosa* como se muestra en este trabajo. Esta proporción también depende de cuál de los grupos amino primarios de la molécula de Spd está glutamilado, como se muestra en la Fig. 1. Pero en el caso de Spm, el APAL libre se forma incluso a partir de GluSpm. Y si se supone que APAL se forma en una proporción mucho menor que GluAPAL en la degradación de Spd como se ha propuesto (Yao *et al*, 2011), su velocidad de oxidación por PaPauC mucho más baja que la de GluAPAL favorecerá concentraciones en estado estacionario más altas de APAL que de GluAPAL.

La toxicidad del APAL se ha explicado por la formación por β -eliminación espontánea del aldehído altamente reactivo acroleína (Alarcon, 1964), aunque todavía no se sabe hasta qué punto esta reacción puede ocurrir en un contexto celular. El APAL también puede ser tóxico por sí solo, porque es un aldehído reactivo que puede formar derivados covalentes al unirse a los grupos amino y sulfhidrilo de las proteínas (Ivanova *et al*, 2002). La proximidad de los grupos amino y aldehído en el APAL podría incrementar la electrofilicidad de su carbono carbonilo en comparación con la de los aldehídos que carecen del grupo amino, y esto podría explicar la mayor toxicidad del APAL para las células en comparación con el formaldehído, acetaldehído y propionaldehído (Sharmin *et al*, 2001). De

hecho, el ABAL también es tóxico (Wood *et al*, 2007), aunque mucho menos que el APAL, como se muestra en este trabajo con células de *P. aeruginosa*. A diferencia del ABAL, que forma la Δ^1 -pirrolina no reactiva por ciclación, la cadena de carbono más corta del APAL no se puede ciclar. La ciclación no enzimática limita la reacción del ABAL con componentes celulares y, por lo tanto, limita sus posibles efectos tóxicos. Tanto la formación de acroleína a partir de APAL como la reactividad aumentada del grupo aldehído del APAL se anulan o disminuyen si el grupo amino forma una amida. Probablemente esta sea una de las principales razones por las que en las células procariotas y eucariotas el grupo amino primario de las poliaminas se modifica químicamente previamente a su degradación, ya sea por acetilación en el caso de células eucariotas y algunas procariotas (Fukuchi *et al*, 1994; Ignatenko *et al*, 1996; Woolridge *et al*, 1999; Forouhar *et al*, 2005; Zhu *et al*, 2006; Franklin *et al*, 2015; Li *et al*, 2019; Tsimbalyuk *et al*, 2020) o por glutamilación como en *P. aeruginosa* y otras bacterias relacionadas (Yao *et al*, 2011; Chou *et al*, 2013; Kurihara *et al*, 2005; Krysenko *et al* 2017). De esta forma, se evita o disminuye la formación de ω -aminoaldehídos libres.

VII.2. *PaPauC* es un nuevo potencial blanco terapéutico contra la infección por *P. aeruginosa*

Los resultados presentados aquí soportan la importancia de *PaPauC* en la toxicidad de Spm, Spd y Dap para las células de *P. aeruginosa*. Por un lado, *PaPauC* juega un papel beneficioso en estas células porque su actividad contribuye en gran medida a disminuir la toxicidad de estas poliaminas al oxidar irreversiblemente al APAL tóxico producido en su degradación hasta la no tóxica beta-alanina, que las células de *P. aeruginosa* pueden utilizar como única fuente de carbono y nitrógeno (Chou *et al*, 2014). Nuestros resultados también

evidencian que *PaPauC* es la principal ALDH involucrada en la destoxificación de APAL en *P. aeruginosa*. Por otro lado, este papel beneficioso tiene una limitación porque la baja eficiencia catalítica de *PaPauC* hacia APAL en comparación con la que tiene con los otros aminoaldehídos producidos en la degradación de Spd y Put, particularmente con GluAPAL, da como resultado una oxidación insuficiente del APAL. Además, aunque hemos encontrado una mayor actividad de *PaPauC* en extractos crudos de células de *P. aeruginosa* incubadas en medios que contienen poliaminas, también hemos encontrado que la actividad de *PaPauC* puede ser muy baja y, por lo tanto, no suficiente para destoxificar el APAL formado en células cultivadas en medios que contienen otras fuentes de carbono y nitrógeno. Aunque una baja actividad de *PaPauC in vivo* parece ser suficiente para sustentar el crecimiento en Put, parece no ser suficiente para evitar la toxicidad de Spm, Spd o Dap en concentraciones incluso más bajas que las de Put, probablemente debido a la baja capacidad de *PaPauC* para oxidar al APAL formado en su degradación a una velocidad adecuada para evitar su acumulación intracelular. Por tanto, *PaPauC* no protegería completamente las células de *P. aeruginosa* contra la toxicidad de Spm, Spd y Dap en condiciones fisiológicas a menos que las concentraciones de estas poliaminas en el medio de crecimiento sean muy bajas. Y precisamente por esto, *PaPauC* surge como un nuevo potencial blanco farmacológico que podría ayudar a combatir este importante patógeno. Su actividad relativamente baja con APAL en presencia de sustratos fisiológicos competidores aumenta su sensibilidad a la inhibición, lo que aumentará en gran medida la susceptibilidad de las células de *P. aeruginosa* a la toxicidad de Spm, Spd o Dap, particularmente en las condiciones que probablemente tienen lugar en los sitios de infección, como por ejemplo un medio rico en nutrientes y la presencia simultánea de Spm, Spd y Put.

El usar como blanco de fármacos el catabolismo de las poliaminas mediante la inhibición de las glutamil-poliaminas sintetasas se ha propuesto por otros investigadores como una estrategia para combatir las infecciones por *P. aeruginosa* (Yao *et al.*, 2012) y *Streptomyces coelicolor* (Krysenko *et al.*, 2021). De hecho, una cepa mutante de *P. aeruginosa* desprovista de PauA2, que es una de las seis glutamilpoliaminas sintetasas presentes en esta bacteria, no creció en presencia de Spm o Spd, aunque sí en Dap que es glutamilado por una glutamilpoliamina sintetasa diferente (Yao *et al.*, 2011). Estos resultados demostraron la importancia de la glutamilación para disminuir la toxicidad de estas poliaminas y están de acuerdo con la ausencia de toxicidad de GluAPAL para células de *P. aeruginosa* encontrada en este trabajo de tesis. Además, estos resultados son consistentes con nuestra propuesta de que uno de los principales responsables de la toxicidad de estas poliaminas es APAL, ya que en ausencia de la actividad glutamilpoliamina sintetasa Spm y Spd solo se degradarán como sus formas libres, lo que conducirá a una considerablemente mayor producción de APAL que cuando opera la vía de glutamilación. En consecuencia, estas poliaminas exhibirán una mayor toxicidad en la cepa mutante $\Delta pauA2$. Pero dado que APAL será oxidado por PaPauC mucho mejor en ausencia de GluAPAL que en su presencia, los niveles intracelulares de APAL en la mutante $\Delta pauA2$ podrían ser más bajos que cuando PaPauC está ausente. Por tanto, para conseguir la acumulación de APAL dentro de las células de *P. aeruginosa* y, por tanto, aumentar la toxicidad de Spm, Spd e incluso la de Dap, la inhibición de PaPauC podría ser una estrategia más eficaz que la inhibición de PauA2. Para probar esta hipótesis, la toxicidad de estas poliaminas debe medirse en los dos tipos de células mutantes de *P. aeruginosa* exactamente en las mismas condiciones experimentales. Claramente, inhibir ambas enzimas, PaPauC y PauA2, podría ser mejor que inhibir solo una de ellas. En particular, la inhibición de PaPauC aumentaría los efectos de la inhibición de

PauA2 ya que, como se mencionó, la ausencia de GluAPAL o niveles más bajos de GluAPAL en relación con los de APAL darían como resultado una oxidación más eficiente del APAL por *PaPauC*. Por tanto, los efectos de la inhibición de PauA2 se contrarrestarían parcialmente si *PaPauC* no se inhibiera simultáneamente.

Las concentraciones de poliaminas reportadas en diferentes tejidos y líquidos de pacientes con fibrosis quística o con cáncer pueden ser demasiado bajas para producir concentraciones tóxicas de APAL en células de *P. aeruginosa* incluso si se inhibe *PaPauC*. Debido a esto, el posible aumento de los niveles de estas poliaminas en los sitios de infección mediante su suplementación en la dieta pudiera ser una estrategia buena y segura para ayudar a combatir la infección por *P. aeruginosa*. Se ha propuesto que Spd y Put imitan los efectos beneficiosos de la restricción calórica sobre la longevidad y tienen muchos otros beneficios para la salud humana (Soda, 2015; Tong y Hill, 2017; Tsikas *et al.*, 2017; Madeo *et al.*, 2018; Madeo *et al.*, 2019; Pietrocola *et al.*, 2019; López-Otín *et al.*, 2016). De hecho, la Spd se promociona actualmente como un suplemento alimenticio bien tolerado por los humanos (Kiechl *et al.*, 2018; Schwarz *et al.*, 2018; Wirth *et al.*, 2019). Además, la suplementación con Spd podría ser una terapia adyuvante para aumentar la eficacia de los tratamientos con antibióticos, como sugiere la mayor susceptibilidad de las células de *P. aeruginosa* a varios antibióticos cuando se agrega Spd a los medios de cultivo (Kwon y Lu, 2006), lo que también se encontró para Spm, Put y Cad—los dos últimos usados a muy altas concentraciones (Kwon y Lu, 2006; Manuel *et al.*, 2010). Incluso se ha reportado el uso de la Spm para combatir la infección por especies de *Pseudomonas* en plantas. El aumento de los niveles de Spm, ya sea por manipulación genética de su síntesis o administrando la poliamina a la planta, aumentó

la resistencia de *Arabidopsis thaliana* al patógeno *Pseudomonas viridiflava* (Gonzalez *et al.*, 2011).

Se han propuesto varios blancos como estrategia para combatir farmacológicamente las infecciones por *P. aeruginosa* (Sigurdsson *et al.*, 2012). Ahora nosotros proponemos a *PaPauC* como un nuevo potencial blanco para combatir este importante patógeno humano porque pensamos que su inhibición tiene varias ventajas sobre los otros blancos propuestos:

- 1) Interrumpiría el catabolismo de las poliaminas, que son compuestos esenciales para las bacterias cuya síntesis y degradación deben estar perfectamente equilibradas. De hecho, el gen *PapauC* se considera parte del genoma central del género *Pseudomonas* (Riveros-Rosas *et al.*, 2019).
- 2) Provocaría la acumulación de aldehídos tóxicos, especialmente APAL.
- 3) Podría ser específica, ya que *PaPauC* pertenece a la familia ALDH27 exclusiva de bacterias (Riveros-Rosas *et al.*, 2013).
- 4) Se facilitaría la búsqueda y diseño de inhibidores específicos dado que se conoce su estructura 3D (PDB 6B4R).
- 5) Podría usarse como terapia adyuvante para aumentar la susceptibilidad de *P. aeruginosa* a los antibióticos.
- 6) Podría incrementar los efectos adversos que la suplementación de Spd en la dieta de pacientes infectados tendría sobre las células de *P. aeruginosa*.

VIII. RESULTADOS

Capítulo II

Investigación de los residuos de aminoácidos importantes para la especificidad por el aldehído de *PaPauC*

VIII.1. Especificidad de *PaPauC* por diferentes sustratos aldehídos

Los datos obtenidos en la primera parte de la tesis muestran el papel de la enzima *PaPauC* en la degradación de las poliaminas y su posible uso como blanco terapéutico. En esta segunda parte nos enfocamos en estudiar la importancia de residuos del sitio activo para determinar la especificidad de esta enzima por sus sustratos aldehídos, lo que esperamos permita no solo conocer a fondo a esta enzima, sino también posteriormente diseñar o seleccionar compuestos como posibles inhibidores específicos de esta enzima.

Como se mencionó en el Capítulo I Sección VI.1., la enzima *PaPauC* recombinante pura mostró actividad hacia ABAL, GluABAL, APAL y GluAPAL, todos ellos sustratos fisiológicos propuestos por otros investigadores en análisis transcriptómicos y confirmados mediante estudios de caracterización cinética por nosotros. En esta parte del proyecto, ampliamos el estudio anterior probando concentraciones más altas de estos sustratos aldehídos, con el fin de cubrir un intervalo de concentración que nos permitiera observar la inhibición por sustrato y de esta forma poder obtener los parámetros cinéticos correctos (Muñoz-Clares y Casanova-Figueroa, 2019). Además, con el fin de obtener más datos para el estudio de las relaciones estructura-función, ensayamos la actividad de la enzima con otros aldehídos: guanidinobutiraldehído (GdBAL), trimetilaminobutiraldehído (TMABAL) y propionaldehído (PAL). El GdBAL se produce en la degradación de Arg y se ha propuesto que es oxidado por *PaPauC* dado que se encontró que era sustrato de una ALDH presente en extractos crudos de células de *P. aeruginosa* crecidas en un medio que contenía Arg, Put o Agm como únicas fuentes de carbono y nitrógeno, mientras que en extractos celulares de una cepa mutante en el gen *pauC* la actividad ALDH con este aldehído como sustrato era despreciable (Jann *et al*, 1988). TMABAL tiene en su estructura un grupo trimetilamino, cargado positivamente pero más voluminoso que el grupo amino del ABAL, y ha sido descrito como intermediario de la degradación del trimetilaminobutanol en la cepa

Pseudomonas sp. 13CM y oxidado por una ALDH de esta bacteria, aunque la identidad de esta ALDH no se conocía (Hassan *et al.*, 2008). PAL es un intermediario de la degradación de isopropilamina (De Azevedo *et al.*, 2002) y además nos interesó estudiarlo para compararlo con APAL en nuestros estudios de las características del aldehído importantes para ser usados como sustratos por la enzima, ya que carece del grupo amino de este último.

PaPauC fue capaz de oxidar todos estos aldehídos con diferente eficiencia catalítica y todos los aldehídos presentaron inhibición parcial de la enzima por sustrato, lo que parece ser una característica de las ALDHs hidrolíticas, derivada de su mecanismo cinético Bi Bi Ordenado en Estado Estacionario. Como se mencionó en Antecedentes, la inhibición por el sustrato aldehído en estas enzimas ocurre por la unión del aldehído al complejo E-NADH formando un complejo E-NADH-aldehído no productivo (Fig. 5) (Muñoz-Clares y Casanova-Figueroa, 2019). Los parámetros cinéticos para estos aldehídos se determinaron en experimentos de velocidad inicial manteniendo constante NAD^+ a 0.6 mM y los resultados se muestran en la Fig. 14 y la Tabla 4. En cada panel de la Fig. 14 se muestran tres curvas: con líneas continuas, las calculadas a partir del mejor ajuste de los datos a la ecuación de Michaelis-Menten que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2); con líneas punteadas, las curvas simuladas usando los parámetros V_{max} y K_m estimados en los ajustes representados por las líneas continuas y simuladas usando la ecuación de Michaelis-Menten que no considera inhibición por sustrato (Ec. 1); con líneas continuas en el inserto, las que se obtienen si solo los datos de velocidad que aparentemente no tienen inhibición por sustrato se ajustan a la Ec.1. Esto lo presentamos así con el fin de resaltar que la velocidad empieza a disminuir por efecto de la inhibición por sustrato antes de que esa disminución sea aparente; de aquí, la importancia de que los parámetros cinéticos se obtengan usando todos los datos de velocidad obtenidos en un amplio intervalo de concentración de sustrato para poder observar completamente la inhibición por sustrato. En la Tabla 4 se dan los parámetros cinéticos estimados usando el conjunto completo de los datos y su ajuste a la Ec. 2. Con fines comparativos, en la Fig. 15 y Tabla 4 se incluyen los parámetros cinéticos estimados sin considerar la inhibición por sustrato y como se puede ver sistemáticamente se subestiman los valores de k_{cat} y K_m y por tanto se sobreestiman los valores de k_{cat}/K_m . Sin embargo, los resultados cualitativamente son similares a los obtenidos considerando todos los datos, por

lo que las conclusiones derivadas de los valores de estos parámetros, en particular las referentes a la preferencia de la enzima por los diferentes aldehídos probados, no cambian.

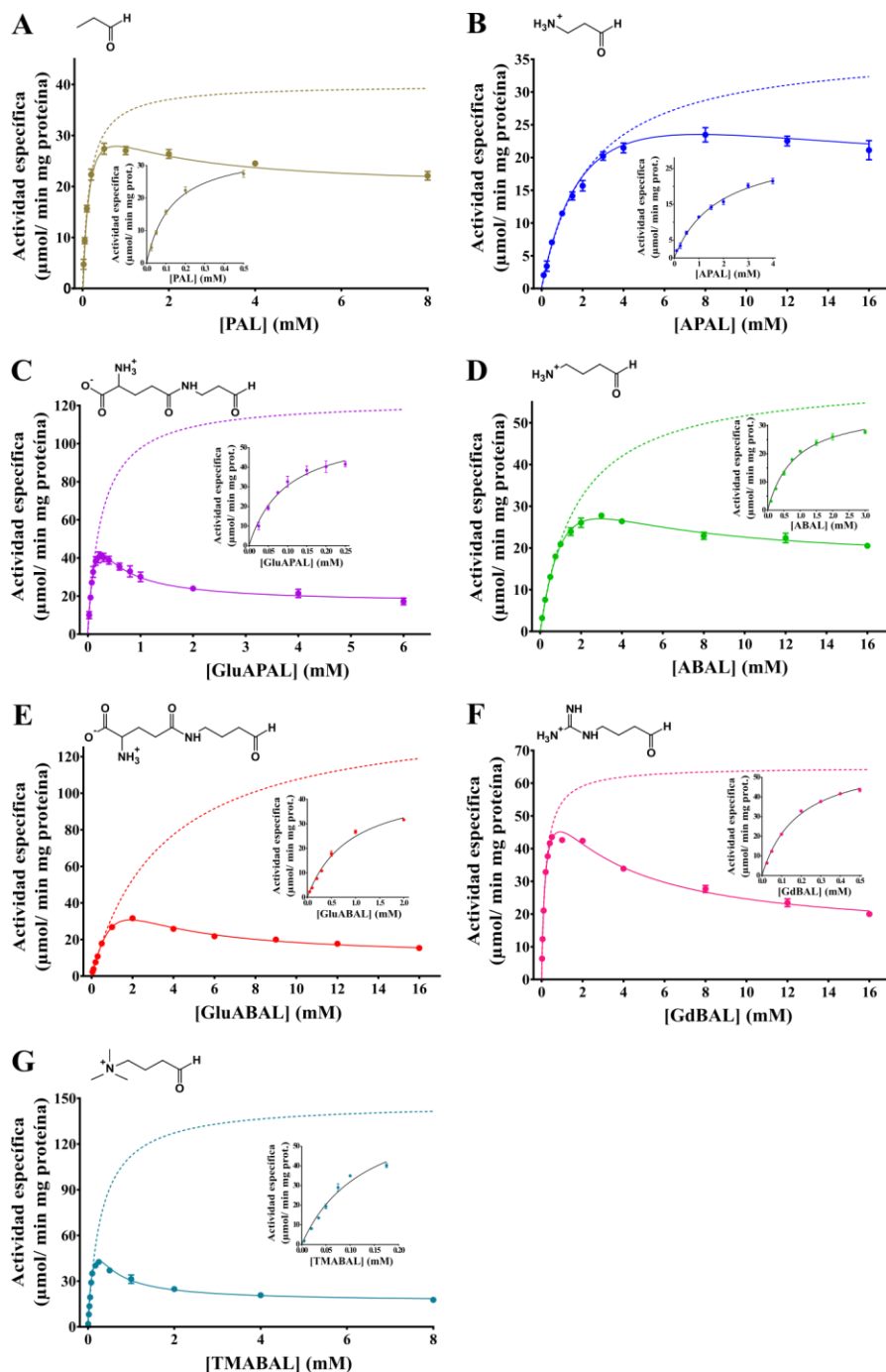


Fig. 14. Cinética de saturación de la enzima *PaPauC* por diferentes aldehídos. (A-G) Los aldehídos se usaron en el intervalo de concentración mostrado en cada panel y la concentración de NAD^+ se mantuvo constante a 0.6 mM. En las gráficas, los puntos son el

promedio de los valores experimentales obtenidos en al menos dos repeticiones y las líneas verticales indican la desviación estándar de este valor promedio. En cada panel se muestran las curvas de saturación obtenidas ajustando el conjunto completo de los datos a la Ec. 2, correspondiente a inhibición parcial por sustrato (líneas continuas) y las curvas teóricas de saturación predichas en ausencia de la inhibición por sustrato (líneas punteadas). En los insertos se muestran los ajustes que se obtienen si se ajustan a la Ec.1 solo los datos de velocidad que aparentemente no tienen inhibición por sustrato. Además, en cada panel se muestra la estructura química del aldehído correspondiente.

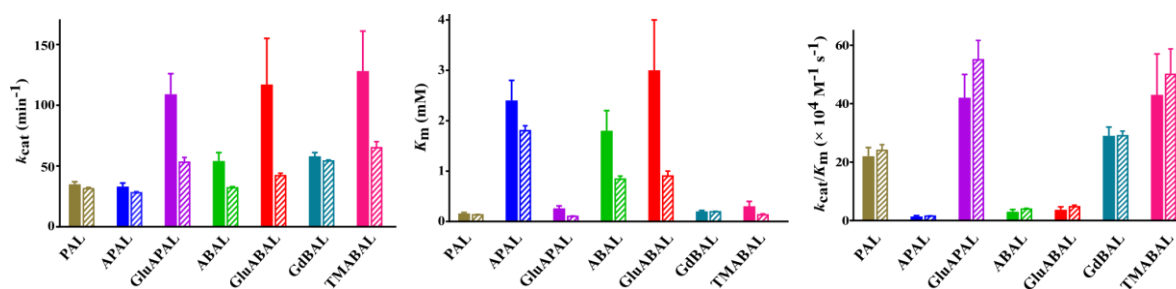


Fig. 15. Comparación de los parámetros cinéticos de la enzima *PaPauC* con diferentes aldehídos y diferentes ajustes. Las barras sólidas indican los parámetros cinéticos estimados usando el conjunto completo de datos experimentales y su ajuste mediante la ecuación de Michaelis-Menten que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2). Las barras rayadas diagonalmente indican los parámetros cinéticos estimados mediante la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) ajustando solo los datos de velocidad que aparentemente no tienen inhibición por sustrato. Las barras verticales indican la desviación estándar del valor estimado de estos parámetros.

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la enzima silvestre PaPauC con diferentes aldehídos como sustratos. Las velocidades iniciales se midieron a 30 °C, pH 8.0 y 0.6 mM de NAD⁺. Los parámetros cinéticos y sus desviaciones estándares se estimaron por el ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales de velocidad inicial a la ecuación de inhibición parcial por sustrato (Ec. 2; datos completos) o a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1; datos experimentales de velocidad inicial que aparentemente no tienen inhibición por sustrato). El valor de k_{cat} se calculó por sitio activo de la enzima, es decir, se calculó teniendo en cuenta la masa molecular del monómero. N. A., no aplica.

Sustrato	Parámetro cinético						
	V_{max} (U mg prot ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($\times 10^4 M^{-1} s^{-1}$)	$V_{max inh}$ (U mg prot ⁻¹)	$k_{cat inh}$ (s ⁻¹)	K_{IS} (mM)
<i>Datos completos</i>							
PAL	40 ± 2	35 ± 2	0.16 ± 0.02	22 ± 3	20 ± 1	18 ± 1	1.1 ± 0.3
APAL	37 ± 3	33 ± 3	2.39 ± 0.40	1.4 ± 0.3	14 ± 0	12 ± 0	10 ± 3
GluAPAL	123 ± 19	109 ± 17	0.26 ± 0.05	42 ± 8	16 ± 1	14 ± 1	0.16±0.04
ABAL	61 ± 8	54 ± 7	1.81 ± 0.35	3.0 ± 0.8	16 ± 1	14 ± 1	1.8 ± 0.7
GluABAL	132 ± 43	117 ± 38	3.14 ± 1.00	3.7 ± 1.0	10 ± 1	9 ± 1	0.8 ± 0.4
GdBAL	65 ± 3	58 ± 3	0.20 ± 0.02	29 ± 3	13 ± 2	12 ± 2	3 ± 1
TMABAL	144 ± 37	128 ± 33	0.30 ± 0.10	43 ± 14	16 ± 1	14 ± 1	0.14±0.05
<i>Datos aparentemente sin inhibición</i>							
PAL	35 ± 1	31 ± 1	0.13 ± 0.01	24.0 ± 2.0	N. A.	N. A.	N. A.
APAL	31 ± 1	28 ± 1	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	N. A.	N. A.	N. A.
GluAPAL	60 ± 4	53 ± 4	0.10 ± 0.01	55.0 ± 6.6	N. A.	N. A.	N. A.
ABAL	37 ± 1	32 ± 1	0.84 ± 0.06	3.9 ± 0.3	N. A.	N. A.	N. A.
GluABAL	47 ± 2	42 ± 2	0.9 ± 0.1	4.7 ± 0.6	N. A.	N. A.	N. A.
GdBAL	61 ± 1	54 ± 1	0.19 ± 0.01	29.0 ± 1.6	N. A.	N. A.	N. A.
TMABAL	74 ± 6	65 ± 5	0.13 ± 0.02	50.0 ± 8.7	N. A.	N. A.	N. A.

De acuerdo con los valores de k_{cat}/K_m , el orden de preferencia de la enzima *PaPauC* por los aldehídos ensayados fue: GluAPAL = TMABAL > GdBAL > PAL > GluABAL \approx ABAL > APAL. El GluAPAL, intermediario de la degradación de Spm, Spd y Dap, es con claridad el mejor sustrato de la enzima junto con el TMABAL. Sin embargo, aún no se conoce si el TMABAL que se produce *in vivo* tiene alguna función fisiológica, o si la bacteria podría encontrar en su ambiente este compuesto o a algún precursor. Por ejemplo, se ha reportado que el trimetilaminobutanol es oxidado a TMABAL por una alcohol deshidrogenasa presente en una cepa de *P. aeruginosa* (Hassan *et al.*, 2007) siempre que se encuentre disponible en su medio de crecimiento. El peor sustrato de *PaPauC* es el APAL, cuya constante de especificidad es 30 veces menor que la del GluAPAL. Por tanto, en el contexto de lo mencionado en el Capítulo I, Sección VI.1, esta última observación tiene importantes implicaciones fisiológicas, ya que contribuye a explicar la toxicidad de las poliaminas Spm, Spd y Dap.

Resulta interesante que los valores de $V_{max\ inh}$ de la reacción (es decir, la V_{max} que presenta la forma inhibida de la enzima) y sus correspondientes valores de k_{cat} , son muy parecidos para todos los aldehídos, lo que sugiere que el paso limitante de la velocidad de esta ruta inhibida es el mismo para todos ellos y que tal paso no depende de la estructura del sustrato aldehído o del producto ácido. Este paso limitante podría ser la liberación del NADH del complejo no productivo enzima-NADH-aldehído, o bien la unión del NAD^+ al complejo enzima-aldehído para empezar un nuevo ciclo catalítico (ver Fig. 5 en la sección de Antecedentes). Cualquiera que sea el paso limitante de la velocidad en la ruta inhibida, el mecanismo que proponemos causa la inhibición por el sustrato aldehído implica que las concentraciones de estado estacionario del complejo enzima-NADH serían altas, lo que a su vez indica que la liberación del NADH de este complejo es el paso limitante de la velocidad de la reacción cuando sigue la ruta normal no inhibida—aunque podría ser más rápido que la liberación del NADH del complejo enzima-NADH-aldehído. También encontramos interesante que, con varios de los aldehídos estudiados, GluAPAL, GluABAL, TMABAL y ABAL, la K_{IS} es menor o igual que la K_m . Aunque en el mecanismo cinético Bi Bi Ordenado en Estado Estacionario seguido por esta enzima (Cardona-Cardona, 2017), la K_m no es la constante de disociación del sustrato del complejo productivo que forma con la enzima (complejo enzima- NAD^+ -aldehído) ni la K_{IS} es la constante de disociación del sustrato del

complejo no productivo (complejo enzima-NADH-aldehído), los valores pequeños de la K_{15} relativos a los de la K_m tienen la consecuencia práctica de que la inhibición por sustrato empieza a ser significativa a concentraciones bajas y disminuye de forma importante el valor de la velocidad más alta que puede experimentalmente ser observado. De aquí la gran diferencia entre la V_{max} real de la enzima con estos sustratos y la velocidad experimental más alta, como puede observarse en la Fig. 14.

Sorprendentemente para nosotros, encontramos que la k_{cat}/K_m de APAL es unas 15 veces menor que la de PAL, cuando esperábamos una preferencia por APAL gracias a la interacción de su grupo amino con algún residuo del sitio activo. Puesto que el valor de k_{cat} con los dos aldehídos es muy parecido, una posible explicación a este hallazgo es que ambos se unen igual cuando forman el complejo catalítico pero que el paso de unión para formar este complejo en lugar de favorecerse por el grupo amino del aldehído, se dificulta, probablemente porque puede interactuar con residuos del sitio activo que lo desvían de la posición correcta. En otras palabras, mientras que el PAL en el sitio activo está relativamente libre para adoptar la posición catalíticamente eficiente, el APAL podría unirse de varias formas que no le permitirían adoptar esa posición.

VIII.2. Descripción del sitio activo de *PaPauC*

En la Fig. 16 se muestra el sitio activo de la enzima *PaPauC* y los diferentes residuos de aminoácidos que lo conforman.

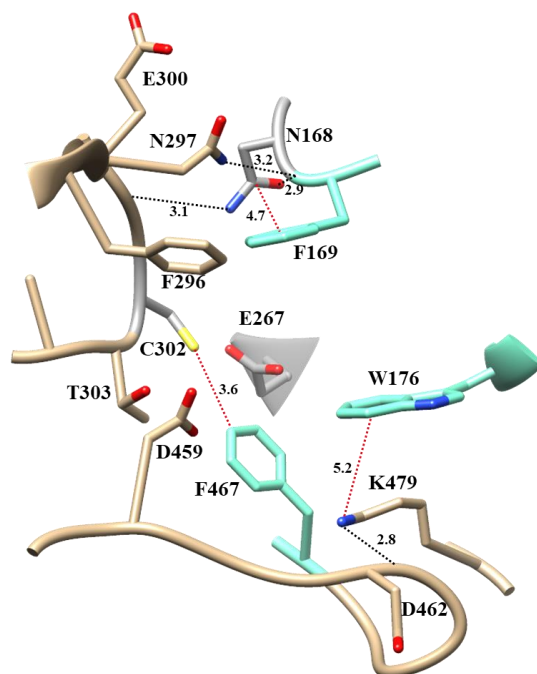


Fig. 16. Sitio activo de la enzima *PaPauC*. En color gris se muestran los residuos catalíticos: C302 en la conformación “de ataque”, N168 en la conformación que siempre adopta en las ALDHs, y E267 en la conformación “intermedia”. En color aguamarina se muestran los residuos aromáticos F169, W176 y F467 que forman la caja de aromáticos. En color café se muestran otros residuos del sitio activo para los cuáles aún no se ha descrito una función específica pero que pudieran ser importantes ya sea para ayudar a mantener la correcta conformación de los residuos catalíticos, para la unión y/o especificidad por el sustrato aldehído o para la catálisis. Los residuos de aminoácidos se muestran como varillas coloreadas por átomos (carbonos en café, gris o aguamarina, nitrógenos en azul, oxígenos en rojo, azufres en amarillo). Las líneas punteadas negras indican las interacciones de puente de H y las líneas punteadas rojas indican las interacciones π . Las distancias están dadas en angstroms (Å).

En color gris están los tres residuos que se han denominado residuos catalíticos debido a su relevante función en la reacción de oxidación de los aldehídos hasta sus respectivos ácidos carboxílicos: C302, N168 y E267. En el cristal de *PaPauC*, la cadena lateral de C302 se observó en la posición “de descanso” en todas las subunidades (Muñoz-Clares *et al.*, 2010) y su grupo tiol oxidado a ácido sulfénico en las subunidades A y C y reducido en las subunidades B y D, pero para poder obtener poses en las simulaciones de acoplamiento molecular en las que el aldehído estuviera unido de manera productiva, esta cadena lateral se cambió a la posición “de ataque”, en la que su grupo tiol está en posición para llevar a cabo

el ataque nucleofílico al carbono carbonílico del aldehído sustrato. En esta posición su grupo tiol está a una distancia y orientación adecuadas para establecer una interacción anión- π con el residuo aromático F467 cuando este tiol esté “activado” como tiolato. De esta forma la F467 puede contribuir a estabilizar el tiolato, que es un agente nucleofílico mucho mejor que el tiol. Por su parte, E267 es el residuo que “activa” a la molécula de agua quitándole un protón de manera que el ion hidróxido formado realiza el ataque nucleofílico que rompe el enlace tioéster y libera el producto ácido de la reacción y a la cisteína catalítica. En el cristal lo observamos en la posición llamada “intermedia” (González-Segura *et al.*, 2009) que es la adecuada para llevar a cabo la activación del agua hidrolítica al estar a distancia de puente de H lo que le permite abstraer de esta molécula de agua un protón. En cuanto a N168, es importante mencionar las siguientes observaciones relevantes: 1) El nitrógeno amídico de su cadena lateral forma, junto con el nitrógeno amídico de la cadena principal de la cisteína catalítica, el hoyo del oxianión en el que mediante dos puentes de hidrógeno se estabiliza la carga del oxianión que se genera en los intermediarios tetraédricos de la reacción. 2) Observamos que el nitrógeno del grupo amida de la cadena lateral de N168 está a distancia de puente de H del carbonilo de la cadena principal de E300, cuyo oxígeno está también unido por puente de H con el nitrógeno amídico de la cadena principal de la misma N168. Además, el grupo amida está a una distancia adecuada (3.4 Å) para hacer una interacción π - π con el anillo aromático de F169. 3) A su vez el anillo aromático de F169 también está a distancia (3.4 Å) y orientación adecuadas para hacer una interacción π - π con el grupo amida de la cadena lateral de N297, como parece hacerlo con el de N168. Y la cadena lateral de N297 está a distancia de puente de H del carbonilo de la cadena principal de N168.

Esta red de interacciones entre N168, F169 y N297 no han sido descritas previamente para ninguna ALDH, pero hemos encontrado que sí están presentes en las varias de estructura conocida que hemos analizado a este respecto (*PaBADH* código PDB 2WME; *SoBADH* código PDB 4A0M; *ALDH9A1* código PDB 6VR6 y *ALDH2* código PDB 1CW3). Esta conservación sugiere que pueden ser relevantes para los pasos catalíticos de las ALDHs en general, ya que ayudan a mantener la posición del asa en que se encuentran los residuos N168 y F169 y mantienen al nitrógeno amídico de N168 en su posición correcta para formar un puente de hidrógeno con el oxianión formado en la reacción.

En color aguamarina se muestran los residuos F169, W176 y F467 que forman la “caja de aromáticos” descrita en otras ALDHs y que participa en la unión a estas enzimas de aldehídos que poseen un grupo amino (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012 Riveros-Rosas *et al.*, 2013). Pero esta “caja de aromáticos” también se observa en otras ALDHs que no unen aminoaldehídos (Riveros-Rosas *et al.*, 2013), lo que sugiere que además tienen una función en catálisis. Ya hemos propuesto un papel para F169 estabilizando la posición de N168 y de F467 que puede hacer una interacción anión- π con el tiolato de C302, lo que contribuiría a su estabilización y por tanto a la reactividad de la cisteína catalítica. W176 está a una distancia adecuada para hacer una interacción catión- π con el grupo amino de K479, lo que probablemente contribuye a que esta lisina tenga la posición adecuada para interactuar con los aminoaldehídos glutamilados que son sustrato de la *PaPauC*.

En la Fig. 16 también se muestran en color café los residuos que están a distancias adecuadas para hacer puentes de H o interacciones π de cualquier tipo con los demás residuos del sitio activo. El grupo amino de la cadena lateral de K479, además de la interacción mencionada con W176, puede hacer un puente de H con el carbonilo de la cadena principal de D462. Posiblemente estas interacciones ayuden a mantener la posición del asa que se encuentra a la entrada del túnel de acceso del aldehído al sitio activo y que en parte determina el tamaño de la entrada de este túnel. El grupo carboxilo de la cadena lateral de D459 no hace ninguna interacción con algún grupo de cadena lateral o principal de la proteína. Sin embargo, está en una posición que permite suponer que puede interactuar con los grupos amino cargados positivamente de los sustratos de *PaPauC*. Igualmente, la cadena lateral de T303 no parece hacer ninguna interacción con residuos de la proteína, a excepción de una interacción de van der Waals con el anillo aromático de F467, pero está situada de forma tal que podría hacer puentes de hidrógeno con los sustratos aldehídos.

En conjunto, todas las interacciones que pueden darse en el sitio activo de *PaPauC* le confieren la especificidad por los diferentes sustratos aldehídos y ayudan a mantener la estructura y conformación adecuadas para llevar a cabo la catálisis.

VIII.3. El acoplamiento molecular de los sustratos aldehídos en el sitio activo de la enzima *PaPauC* mostró residuos de aminoácidos posiblemente involucrados en su unión

El acoplamiento molecular realizado como se describe en la sección de Materiales y Métodos de la tesis arrojó entre 300 y 600 poses por aldehído. Se realizó un agrupamiento de estas poses con el criterio de que tuvieran un valor de RMSD $< 2.5 \text{ \AA}$ de todos los átomos del ligando. Todas las poses en cada grupo cayeron en la misma zona y tienen orientación parecida. De ellas, se seleccionaron aquellas (mostradas en la Fig. 17) que colocaban al aldehído en su subsitio de unión en el sitio activo y cumplían con los siguientes criterios: 1) distancia del carbono carbonílico del aldehído al tiol de la Cys catalítica de 6 \AA o menos; 2) conformación más cercana a un complejo precatalítico, en el que el oxígeno del grupo aldehído estuviera a una distancia a la que potencialmente podía formar puentes de hidrógeno con el nitrógeno amídico de la cadena principal de C302 y el nitrógeno amídico de la cadena lateral de N168 y el grupo tiol de la cisteína C302 a distancia razonable para llevar a cabo el ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del aldehído; 3) energías de unión más negativas; y 4) el número de miembros de cada grupo.

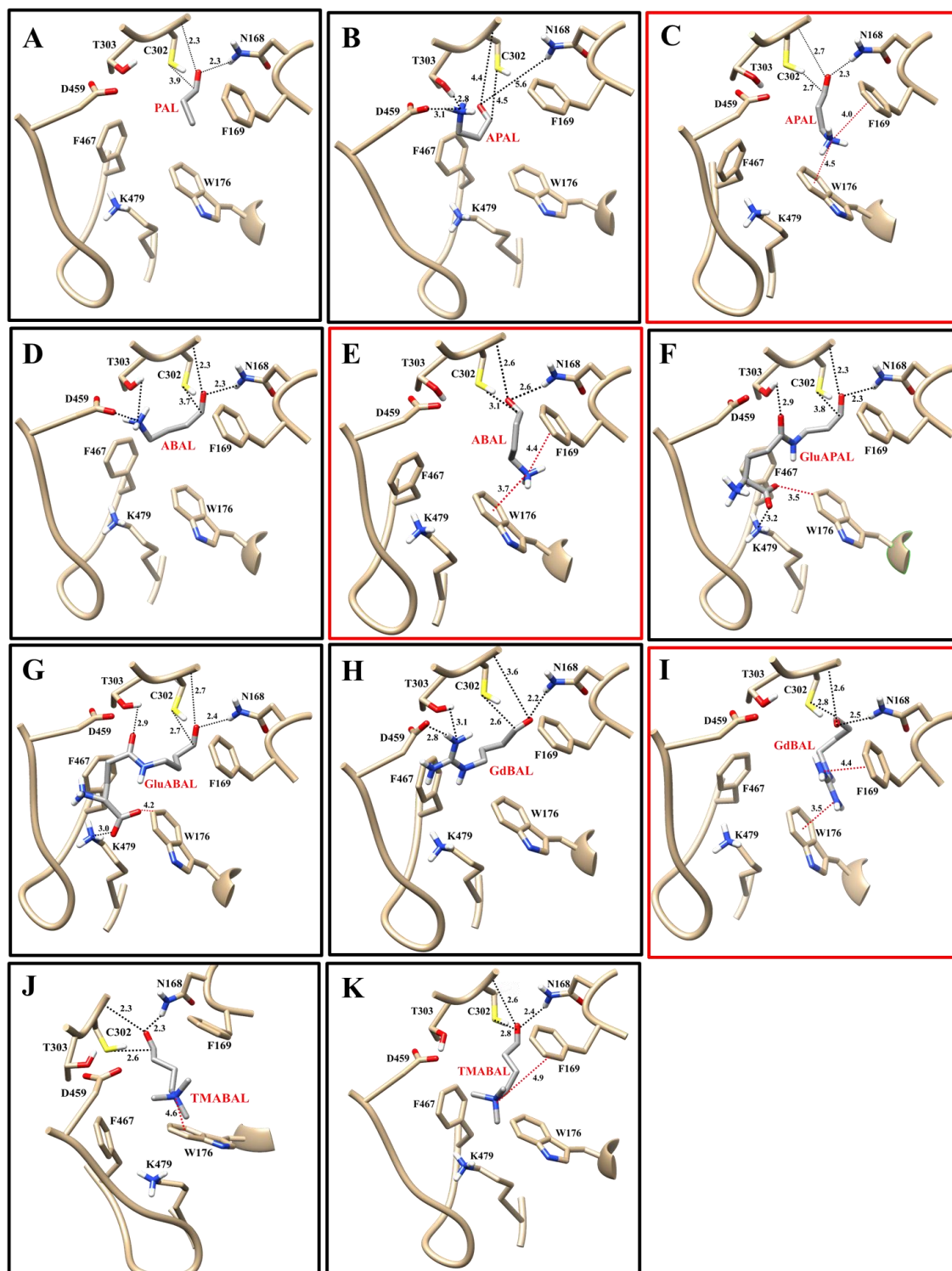


Fig. 17. Acoplamiento molecular de aldehídos en el sitio activo de *PaPauC*. Se muestran las posiciones más favorables dadas por el programa de acuerdo con los criterios de selección ya mencionados, así como los residuos posiblemente implicados en su unión. Además, se muestran las distancias entre el oxígeno del grupo carbonilo con el nitrógeno amídico de la cadena lateral de la N168 y el nitrógeno amídico de la cadena principal de la C302 catalítica

que indican si se trata o no de una unión que forma un complejo catalíticamente competente. También se dan las distancias (en angstroms) de los posibles enlaces entre los aldehídos y las cadenas laterales de T303, D459, W176, F467 y K479 cuando la simulación sugería una posible interacción con ellos. Las líneas punteadas negras indican las interacciones de puente de H y las líneas punteadas rojas indican las interacciones catión- π . Los recuadros rojos corresponden a los acoplamientos realizados manualmente.

PAL no interacciona con ningún residuo al carecer de un grupo amino capaz de establecer algún puente de H o un enlace salino, pero tampoco se identificaron múltiples contactos de van der Waals claros, pese lo cual las simulaciones de acoplamiento molecular sí arrojaron una pose potencialmente óptima para la catálisis (Fig. 17A). Por el contrario, en el caso del APAL no se obtuvo una pose que cumpliera los requisitos de un complejo pre-catalítico, probablemente, porque la contribución energética del grupo amino de este aldehído (aquí estimada por un campo de fuerzas) con las cadenas laterales de T303 y D459 resulta dominante, reduce los grados de libertad y baja la probabilidad de observar una conformación compatible con la catálisis (Fig. 17B). Es decir, se genera un efecto entrópico que puede impactar negativamente en la especificidad por este sustrato. Pareciera entonces que estos residuos, o al menos uno de ellos, “estorban” para que el APAL se una en forma catalíticamente eficiente, lo que puede explicar el valor de la k_{cat}/K_m (APAL) 20 veces menor que el de la k_{cat}/K_m (PAL). El acoplamiento manual del APAL dentro del sitio activo en una posición en la que se cumplieran los requisitos para la catálisis sugirió que puede adoptar una posición en la que su grupo amino estaría a distancia para hacer interacciones catión- π con los residuos aromáticos F169 y W176 (Fig. 17C). Sin embargo, los campos de fuerza no incluyen una buena descripción de interacciones de naturaleza puramente electrónica, tales como apilamientos π , catión- π o anión- π , lo que explica la dificultad de observar la pose mostrada en la Fig. 17C en los resultados de simulación realizados con Autodock VINA.

Los resultados de las simulaciones de acoplamiento molecular con ABAL mostraron claramente que sí intervienen las cadenas laterales del D459 y de la T303 en su unión catalíticamente apropiada (Fig. 17D), pero tampoco se obtuvo una pose mostrando posibles interacciones catión- π con los residuos aromáticos, probablemente debido a que este tipo de interacciones no son consideradas por el programa usado, como se ha comentado. Sin embargo, al igual que en el caso de APAL, el acoplamiento manual mostró que sí podrían

darse estas interacciones con ABAL. Encontramos que el grupo amino del ABAL sí puede colocarse entre los anillos de F169 y W176, en posición y distancias correctas para establecer interacciones catión- π con ambos residuos, aunque se pierden las interacciones con D459 y T303 (Fig. 17E). Pudiera ser que tanto APAL como ABAL tuvieran al menos dos formas de unirse para formar el complejo pre-catalítico.

En cuanto a los derivados glutamilados de APAL y ABAL, las simulaciones de acoplamiento molecular sugirieron puentes de hidrógeno entre el carbonilo del grupo amida de GluAPAL y GluABAL y el hidroxilo de la cadena lateral de T303 (Fig. 17F y 17G). Además, estas simulaciones predijeron un puente salino entre el grupo α -carboxilo del glutamil y el grupo ϵ -amino de K479 y que este α -carboxilo, además está a una distancia y orientación adecuadas para hacer una interacción anión- π con el residuo aromático de W176. Para explorar si también se podrían dar interacciones del grupo α -amino de GluAPAL y GluABAL con los residuos aromáticos, hicimos los acoplamientos moleculares en forma manual por las limitaciones ya mencionadas para detectar este tipo de interacciones de los programas que usamos para las simulaciones. Sin embargo, no encontramos poses mejores que las del acoplamiento molecular automático.

Para el GdBAL, otro derivado de ABAL que también es un sustrato fisiológico de *PaPauC*, la mejor pose pre-catalítica que arrojó el acoplamiento molecular fue la que indicaba un puente salino del grupo guanidino con D459 y un puente de hidrógeno con T303 (Fig. 17H). El acoplamiento molecular en forma manual indicó que el grupo guanidino podría también colocarse en la orientación y distancia adecuadas para hacer interacciones catión- π con los anillos F169 y W176 (Fig. 16I), pero perdería las interacciones con D459 y T303. Quizás GdBAL pueda adoptar cualquiera de estas dos conformaciones al unirse al sitio activo de *PaPauC*.

Finalmente, para el TMABAL, otro derivado de ABAL que, es un buen sustrato *in vitro* de *PaPauC*, aunque no sabemos si la enzima lo encontrará bajo condiciones fisiológicas, los resultados del acoplamiento molecular mostraron que el grupo trimetilamino se ubica a una distancia y orientación adecuadas para hacer interacciones catión- π con el anillo aromático de F467 (Fig. 17J) o de F169 (Fig. 17K). Los acoplamientos moleculares hechos en forma manual tampoco mostraron una mejor pose que las dadas por el acoplamiento molecular automático.

VIII.4. Mutagénesis sitio-dirigida de los residuos sugeridos por los acoplamientos moleculares como importantes en la unión de los sustratos aldehídos

En conjunto, los resultados del acoplamiento molecular sugirieron que los residuos polares T303 y D459 y los aromáticos F169, W176 y F467 podrían participar en la determinación de la especificidad de *PaPauC* por los aldehídos—como ya habíamos sospechado por simple inspección visual—y además mostraron que K479 también puede ser importante para la unión de los derivados glutamilados de los aminoaldehídos. Para confirmar estas predicciones, realizamos mutagénesis sitio-dirigida cambiando individualmente cada uno de estos residuos por alanina. El D459 también se cambió por asparagina para investigar el efecto de la carga negativa de este residuo sin afectar el tamaño de la cadena lateral. Todas las mutaciones se comprobaron por secuenciación y una vez que las enzimas variantes fueron expresadas y purificadas a homogeneidad se sometieron a cromatografía de exclusión molecular para estudiar su estado oligomérico (Fig. 18) y se hicieron estudios de estabilidad térmica mediante fluorimetría diferencial de barrido (Fig. 18) para investigar si el cambio en el residuo afectaba la estructura de la enzima. Después, se estudió su cinética de saturación con todos los aldehídos que se habían estudiado con la enzima silvestre (Figs. 20 a 27).

VIII.4.1. Estado oligomérico de la enzima PaPauC silvestre y sus variantes

La enzima *PaPauC* recombinante silvestre purificada a homogeneidad (Fig. 18A) fue estable durante varios meses cuando se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en las condiciones especificadas en la sección de Materiales y métodos. La masa molecular de la subunidad de la *PaPauC* silvestre estimada por SDS-PAGE (Fig. 18A) fue de 54 kDa, un valor cercano a 56.6 kDa, que es la masa predicha para la secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante por el programa *ProtParam* (Gasteiger *et al.*, 2003). Las enzimas variantes una vez purificadas produjeron bandas en SDS-PAGE que corresponden al mismo tamaño (resultados no mostrados). La enzima silvestre y las variantes eluyeron en cromatografía de exclusión molecular (SEC) como un solo pico simétrico (Fig. 18) con el mismo volumen de elución, indicando que los cambios realizados en los residuos no afectaron su estado oligomérico ni produjeron agregación. De acuerdo a la calibración de la columna usada, el volumen de

elución corresponde a una masa nativa de 168 kDa, un valor entre 113 kDa, que es el predicho si la proteína fuera dimérica y 226 kDa, que es el predicho si la proteína fuera tetramérica. Por tanto, los resultados de SEC sugieren que *PaPauC* es un trímero. Sin embargo, llegamos a la conclusión de que el estado de asociación nativa de *PaPauC* es en realidad un tetramero por las siguientes razones: 1) En la mayoría de las ALDHs estudiadas hasta ahora solo se han encontrado enzimas diméricas y tetraméricas—con excepción de la ALDH4 que es hexamérica (Inagaki *et al.*, 2006)—, lo que es consistente con el modo de asociación de las subunidades en un dímero, siendo los tetrameros dímeros de dímeros y los hexámeros trímeros de dímeros. 2) Esta elución anómala de SEC se ha observado antes, por ejemplo, con la BADH de *P. aeruginosa*, que inicialmente se consideró un dímero (Velasco-García *et al.*, 1999) pero luego demostró ser un tetramero (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003; González-Segura *et al.*, 2009), y que, probablemente, esté relacionada con la forma de la proteína o con interacciones no específicas con la matriz de la columna. 3) La estructura cristalina de la enzima *PaPauC* determinada por nosotros (código PDB 6B4R) reveló claramente su naturaleza tetramérica y el plegamiento característico de las enzimas ALDH.

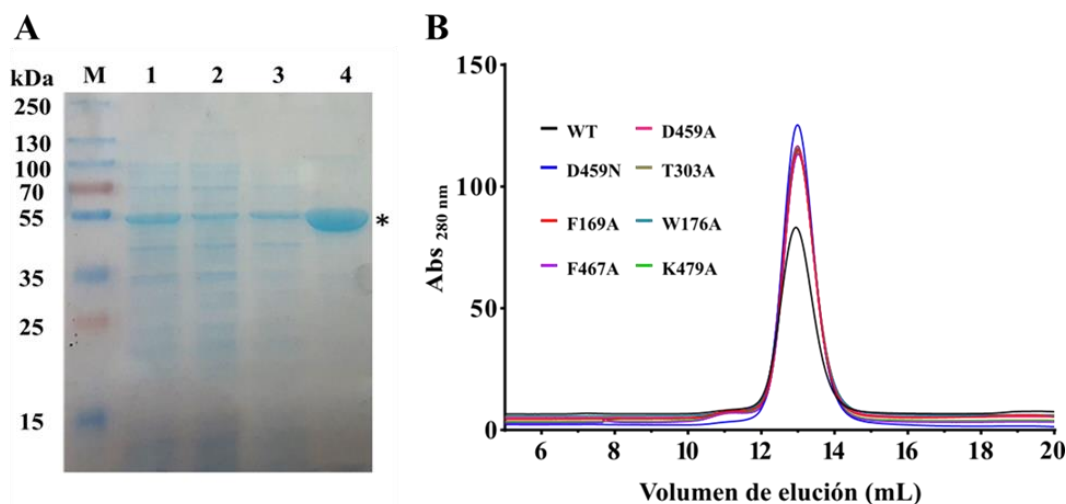


Fig. 18. Purificación de *PaPauC* silvestre y estado oligomérico de *PaPauC* silvestre y variantes. (A) Gel SDS-PAGE que muestra los resultados de la purificación de *PaPauC* silvestre. Carriles: M, marcadores de masa molecular (Thermo Scientific, U.S.A.); 1, sobrenadante del extracto crudo libre de células; 2, proteína no unida a la columna de afinidad por metales; 3, lavado de la columna de afinidad; 4, fracciones eluidas 1 a 4 combinadas. (B) Perfil de elución de la enzima *PaPauC* y sus variantes de la cromatografía de exclusión

molecular. La cantidad de proteína total aplicada de cada proteína fue aproximadamente 1 mg/mL.

VIII.4.2 Estabilidad térmica de la PaPauC silvestre y sus variantes

Los resultados de la fluorimetría diferencial de barrido de las proteínas PaPauC silvestre y sus variantes (Fig. 19) indicaron que, con excepción de la K479A y W176A, todas ellas presentan dos transiciones en la desnaturalización térmica, cuyos valores estimados de T_m se muestran en la Tabla 5. La primera de estas transiciones, de una magnitud mucho menor que la segunda, podría deberse a cambios pequeños y locales en la estructura terciaria, posiblemente restringidos al sitio activo, que afectan la unión del fluoróforo a la proteína. La segunda transición, pensamos que podría corresponder al desplegamiento total de la cadena polipeptídica. Es interesante que esta segunda transición es muy parecida en la proteína silvestre y en las variantes con valores similares de T_m , pero sí se observaron cambios en la primera transición entre ellas.

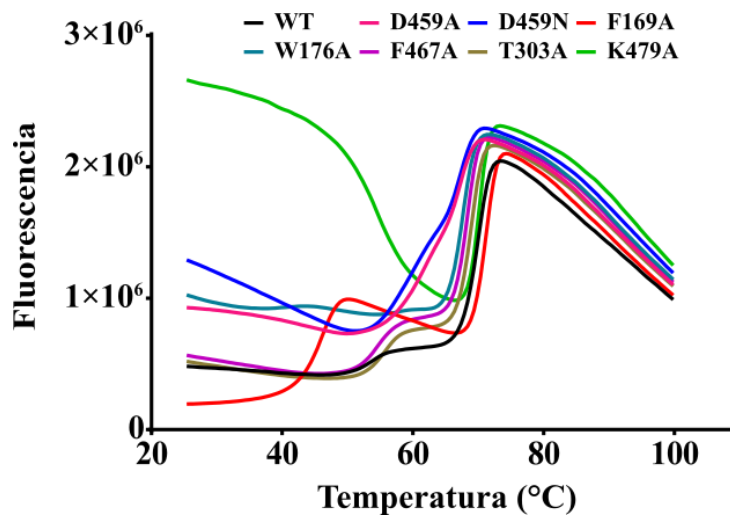


Fig. 19. Estabilidad térmica de la enzima PaPauC y sus variantes. Las líneas son el promedio de tres repeticiones de experimentos de fluorimetría diferencial de barrido. La concentración de proteína usada en todos los casos fue 1.9 mg/mL.

Tabla. 5. Valores estimados de T_m de la enzima *PaPauC* silvestre y sus variantes

Proteína	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)
WT	53.75	69.53
D459A	60.82	66.62
D459N	58.32	66.83
T303A	55.38	68.63
F169A	45.22	70.97
W176A	N. A.	67.36
F467A	54.48	68.02
K479A	N. A.	70.06

La sustitución de D459 por alanina o asparagina produjo una alteración similar en la primera transición—que tuvo un incremento importante en su magnitud y en su T_m , indicando que se debe a la pérdida de la carga del grupo carboxilo de su cadena lateral. Las variantes T303A y F467A mostraron también perfiles de fluorometría de barrido similares en los que se observa un ligero aumento en la magnitud y en la T_m de la primera transición—, lo que sugiere que cambios en la región del sitio activo donde se ubican estos residuos tienen el mismo efecto sobre la estructura de la proteína que se refleja en su estabilidad. La variante F169A es la que experimenta un cambio mayor en la primera transición, aumentando considerablemente su magnitud y disminuyendo muy significativamente su T_m (en 8.5 °C). Esto sugiere una desestabilización del sitio activo en esta variante mayor que en las otras variantes. En cuanto a la variante K479A, la primera transición se elimina, lo que podría ser resultado de que a temperaturas bajas se exponen regiones o residuos hidrofóbicos de la proteína que unen al fluoróforo, o de que facilita de alguna forma el acceso del fluoróforo a estos sitios hidrofóbicos. Tanto en el caso de F169A como en el de K479A, el aumento de

fluorescencia inicial disminuye a medida que la temperatura aumenta y ambas proteínas exhiben una segunda transición con un valor de T_m similar al de la enzima silvestre.

En conjunto estos datos sugieren pequeñas alteraciones estructurales en las variantes, que probablemente sean locales, es decir restringidas al sitio activo, como es de esperarse que ocurran. Creemos que, en la mayor parte de ellas, estos cambios estructurales tienen una influencia menor en la cinética de las variantes, pero han sido tomados en cuenta al discutir los cambios cinéticos observados en ellas, que se describen a continuación.

VIII.5. Cinética de saturación de las variantes de *PaPauC* con los diferentes aldehídos fisiológicos de esta enzima

Realizamos cinéticas de saturación de las variantes con todos los aldehídos y bajo las mismas condiciones que habíamos hecho con la enzima silvestre. En las Figs. 20 a 27 se muestran en color rojo las curvas de saturación obtenidas y con fines comparativos las correspondientes de la enzima silvestre, mostradas en color negro. Los parámetros cinéticos estimados de las variantes se muestran en las Tablas 6 a 12, en las que se incluyen de nuevo los estimados para la enzima silvestre que se dieron en la Tabla 4, con el fin de facilitar la evaluación de los cambios que se observan en las variantes. Empezaremos describiendo los efectos de los cambios en las variantes en la cinética de saturación del PAL, que tomamos como referencia para distinguir posibles efectos generales sobre la oxidación de cualquier aldehído por esta enzima (es decir, efectos sobre la catálisis) de los efectos específicos sobre la unión de un aldehído en particular, ya que la pequeña cadena alifática de PAL no interacciona con ningún residuo del sitio activo, como se observó en las simulaciones de acoplamiento molecular.

*VIII.5.1. Saturación por PAL de las variantes de *PaPauC**

El acoplamiento molecular hecho con este aldehído no mostró interacciones con ningún residuo del sitio activo de la enzima *PaPauC*, lo que es consistente con la estructura alifática de cadena corta del PAL. La única interacción que se observó fue la del grupo carbonilo del aldehído en el hoyo del oxianión haciendo puentes de H con el nitrógeno amídico de la cadena principal de la C302 catalítica y con el grupo amino de la cadena lateral de la N168 catalítica, que es la posición adecuada para que ocurra la reacción. Esperábamos

entonces que el cambio de los residuos elegidos como posibles determinantes de la especificidad no alterara la cinética de saturación de la enzima con este aldehído, pero si encontramos cambios en varias de las enzimas variantes, como se muestra en la Fig. 20 y en la Tabla 6.

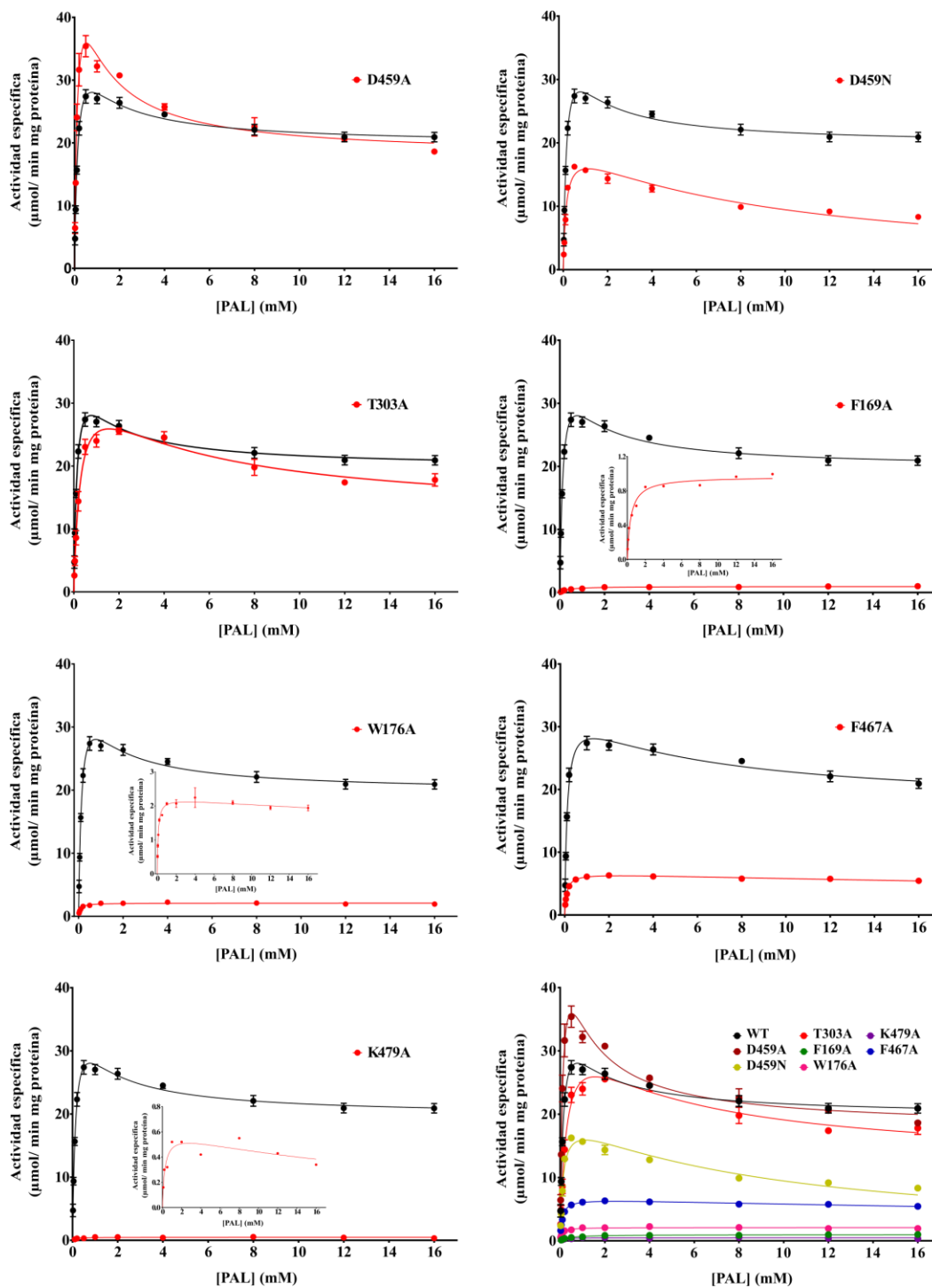


Fig. 20. Curvas de saturación con PAL de las diferentes variantes de PaPauC. En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores de velocidad inicial obtenidos en al menos dos experimentos independientes; las líneas dibujadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o la ecuación que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), como resultó apropiado. Las líneas verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos experimentales. Los puntos negros y sus respectivas curvas corresponden a los datos obtenidos con la enzima silvestre y mostrados antes en la Fig 14. En los paneles correspondientes a las variantes F169A, W176 y K479A se incluye un inserto para mostrar más claramente las saturaciones con este aldehído. Con fines comparativos, en el último panel se muestran todas las curvas de saturación de las enzimas variantes y de la silvestre.

Tabla 6. Parámetros cinéticos de las enzimas *PaPauC* silvestre y variantes usando PAL como sustrato. Las velocidades iniciales se midieron a 30 °C, pH 8.0 y 0.6 mM de NAD⁺. Los parámetros cinéticos se estimaron por el ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o a la ecuación de inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), según fuera apropiado. V_{\max} está dada en U/mg proteína, k_{cat} en s⁻¹, K_m y K_{IS} en mM y k_{cat}/K_m , en M⁻¹s⁻¹ × 10⁴. ND, no determinado. NA, no aplica.

Enzima	WT	D459A	D459N	T303A	F169A	W176A	F467A	K479A
Parámetros cinéticos								
V_{\max}	40 ± 2	56 ± 6	27 ± 3	36 ± 3	0.97 ± 0.02	2.10 ± 0.04	6.7 ± 0.1	0.50 ± 0.04
k_{cat}	35 ± 2	50 ± 5	24 ± 3	32 ± 3	0.86 ± 0.02	1.9 ± 0.04	6.0 ± 0.1	0.44 ± 0.04
K_m	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.30 ± 0.05	0.40 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.13 ± 0.07
k_{cat}/K_m	22 ± 3	36 ± 9	10 ± 2	11 ± 2	0.21 ± 0.02	2.4 ± 0.3	6.7 ± 0.7	0.34 ± 0.2
$V_{\max \text{ inh}}$	20 ± 1	18 ± 1	7 ± 0.7	12 ± 3	NA	NA	4 ± 2	NA
K_{IS}	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.4	1.4 ± 0.5	4.4 ± 2.4	NA	NA	21 ± 26	NA

Tal y como esperábamos las variantes D459A y T303A no muestran cambios importantes en su cinética de saturación por PAL. Aun así, parece que el residuo D459 estorba ligeramente para la unión del PAL y para su correcta colocación en el sitio activo, como lo sugiere el aumento de 1.4-1.6 veces en la k_{cat} y k_{cat}/K_m en la variante en la que este residuo se cambió por alanina con respecto al valor de la enzima silvestre. Este pequeño efecto de D459 se hace mayor si hay una asparagina en esta posición, como lo indica el que la variante D459N tiene disminuidas 1.5-2 veces su k_{cat} y k_{cat}/K_m , respectivamente, con respecto a la enzima silvestre y 2-3.6 veces, respectivamente, con respecto a la variante D459A. La interpretación que nosotros damos a estos resultados es que la cadena lateral de D459 y aun más la de N459 puede adoptar una conformación que dificulte en un cierto grado la unión del aldehído en una posición favorable para la catálisis, probablemente para la formación del tiohemiacetal con la Cys catalítica, que pasaría a ser el paso limitante de la velocidad de la reacción. Si este es el caso, no lo sabemos; se requieren hacer estudios cinéticos de pre-estado estacionario para poder confirmarlo o rechazarlo. Pero no podemos descartar que sea otro paso catalítico como la transferencia del hidruro al NAD^+ , o la hidrólisis del tioéster el que se vea afectado, igualmente a consecuencia de una geometría no óptima de los intermediarios tiohemiacetal o tioéster. No creemos que sea la liberación del NADH porque ello habría dado lugar a un aumento de la concentración de estado estacionario del complejo enzima-NADH y por consiguiente a un aumento en la inhibición por sustrato, lo que no se observó. Resulta interesante que este efecto sobre k_{cat} , o su equivalente V_{max} , se observó tanto en la ruta de reacción no inhibida como en la inhibida, lo que apoya nuestra idea de que se debe a un impedimento estérico que se ejercería sobre la forma en que se une el aldehído tanto para formar el complejo productivo como para formar el complejo no productivo. A este respecto es importante comentar que existen otras ALDHs que poseen un aspártico (ALDH2 código PDB: 1CW3, Ni *et al.*, 1999) o una asparagina (ALDH1A2 código PDB: 6ALJ, Chen *et al.*, 2018) en la posición equivalente a D459 en *PaPauC*, pero la cadena lateral de estos residuos está fuera del sitio activo debido al puente de hidrógeno que hacen con la cisteína o la treonina, respectivamente, en la posición equivalente a la T303 (Fig. 21). En *PaPauC* este puente de hidrógeno no puede darse con D459 ni con la asparagina en la variante D459N porque el asa al que pertenece D459 está movida con respecto a la posición que tiene en las otras enzimas, lo que aleja a D459, y a N459 en la variante, de T303. Por

tanto, pareciera que las cadenas laterales tanto del aspártico en la enzima silvestre como la asparagina en la variante D459N tienen posibilidad de moverse con cierta libertad en el sitio activo, acomodándose al aldehído que entre. Pero, por alguna razón que no tenemos clara, esta libertad podría estar reducida en el caso de la asparagina.

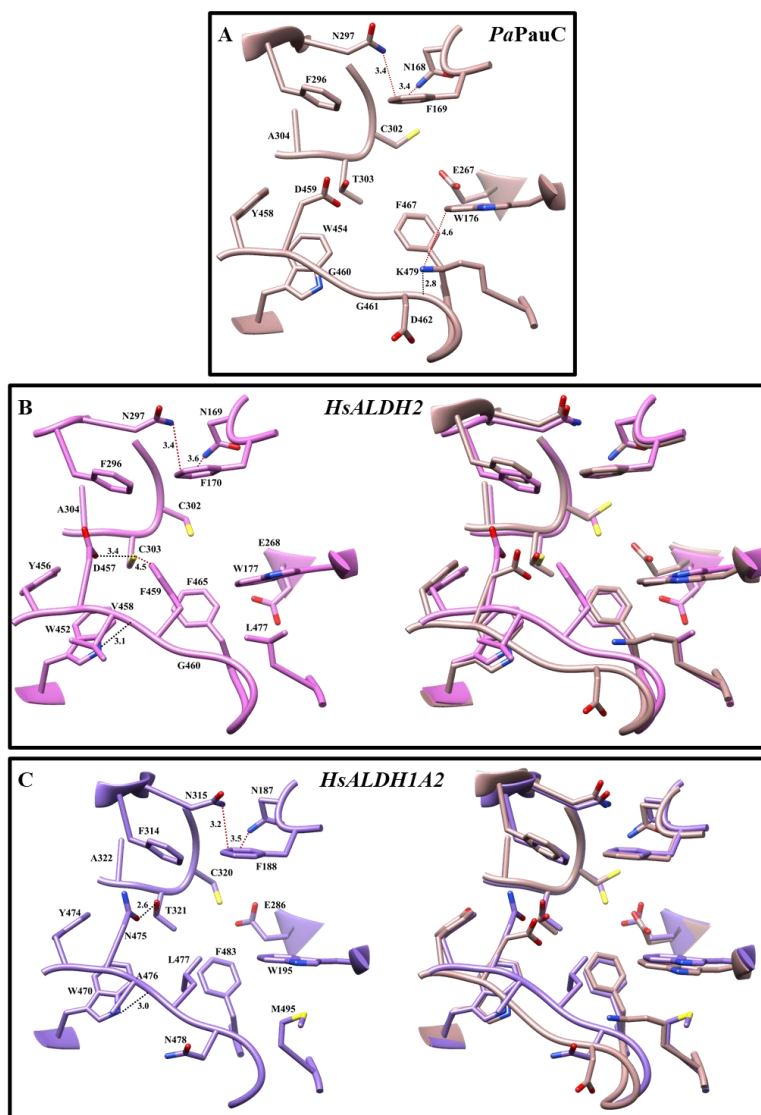


Fig. 21. Comparación de los sitios activos de la enzima *PaPauC* con las enzimas *ALDH2* y *ALDH1A2* de humano. Las cadenas laterales de los aminoácidos están dibujadas como varillas coloreadas por átomo (oxígenos en rojo, nitrógenos en azul, azufres en amarillo) y las cadenas principales como lazos con los átomos de carbono coloreados de acuerdo a la proteína mostrada (café claro para *PaPauC*, magenta para *HsALDH2* y morado para *HsALDH1A2*). La sobreposición de los sitios activos muestra la diferente posición de los residuos equivalentes a D459 *PaPauC* y de las asas donde se encuentran.

También, sorprendentemente para nosotros, encontramos que cuando se cambia cualquiera de los residuos aromáticos por alanina, la k_{cat} de todas estas mutantes disminuye fuertemente, particularmente en la variante F169A en la que disminuye unas 40 veces, lo que sumado a un aumento de 2.5 veces en la K_m produjo una disminución de 100 veces en el valor de k_{cat}/K_m . Como se verá mas adelante, el eliminar el anillo aromático en esta posición tiene efectos muy importantes y similares para todos los demás aldehídos probados, al igual que ya se había encontrado en estudios sobre otra ALDH, la betaína aldehído de espinaca, cuando se cambió por alanina el residuo Y160, equivalente a F169 en *PaPauC* (Díaz-Sánchez *et al.*, 2012). Esto, junto con la casi absoluta conservación del carácter aromático de este residuo en las ALDHs de secuencia conocida, nos lleva a pensar que este residuo participa en los pasos catalíticos de las ALDHs en general, quizás por su efecto sobre la asparagina catalítica, N168 numeración de *PaPauC*, con cuyo grupo amida parece formar una interacción π -stacking. O quizás puede establecer una interacción catión- π si el nitrógeno del grupo amida de N168 tiene una carga residual positiva debido a la resonancia de este grupo, contribuyendo así a su correcto posicionamiento en el sitio activo para formar el “hoyo del oxianión”, como ya hemos comentado. Otro posible papel, también ya comentado más arriba, es que, mediante una interacción anión- π con el oxígeno del grupo aldehído, contribuya a la polarización del carbono carbonílico, haciéndolo mejor electrófilo y facilitando así el ataque nucleofílico del tiol en el paso de la reacción que se forma el intermediario covalente tiohemiacetal. De hecho, la posición de este oxígeno con respecto al anillo aromático de F169 parece ser la adecuada para establecer este tipo de interacción, tanto por la distancia como por su orientación. La variante F467A también mostró una disminución importante en la k_{cat} (de unas cinco veces) y creemos que esto se puede deber a la pérdida de una posible interacción anión- π entre su grupo benceno y el grupo tiol de la cisteína catalítica, que estabilizaría el tiolato. Ambos grupos tienen la orientación y la distancia apropiada para que se dé este tipo de interacción. Además, la variante W176A mostró una disminución de unas 20 veces en el valor de k_{cat} , lo que igualmente sugiere que este residuo es importante para la correcta conformación del sitio activo, por razones que aún no entendemos. Pudiera ser que este efecto se deba a que la eliminación de este anillo aromático desestabilice la conformación correcta de K479, con cuyo grupo amino puede estar haciendo una interacción catión- π cuando el sitio activo está desocupado (Fig. 16). De hecho, como ya mencionamos,

la naturaleza aromática de los tres residuos F169, W176 y F467 se conserva en muchas ALDHs (Riveros-Rosas *et al.*, 2013), incluso en aquellas cuyo sustrato fisiológico no es un aldehído con un grupo cargado positivamente con el que en muchos casos hacen interacciones catión- π . Y de estos tres residuos los que más conservan su naturaleza aromática son los equivalentes a F169 y F467 (Riveros-Rosas *et al.*, 2013), lo que es consistente con nuestra propuesta de que juegan un papel en la catálisis de las ALDHs en general. Y en forma interesante también conservan su conformación en los sitios activos de las ALDHs cristalizadas, como se puede observar en la Fig. 21.

Finalmente se observó una disminución importante en los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m de la variante K479A (la k_{cat} disminuyó 80 veces y la k_{cat}/K_m disminuyó 85 veces) a pesar de que este residuo no interacciona con el PAL. Estas importantes disminuciones en k_{cat} y k_{cat}/K_m de la variante K479A se encontraron con todos los aldehídos probados, lo que nos lleva a pensar que como ya comentamos y sorpresivamente para nosotros, esta mutación parece tener un efecto estructural, como lo indican los datos de fluorometría diferencial de barrido que mostró un incremento muy importante en la fluorescencia a 20 °C con respecto a la enzima silvestre (Fig. 19), lo que sugiere la exposición de residuos hidrofóbicos que no están expuestos en la enzima silvestre. Esto no se debe a que la variante se disocie ni se despliegue parcialmente dando lugar a una especie de glóbulo fundido, como lo muestra el resultado de la SEC, en la que se obtuvo el mismo tiempo de elución que el de la enzima silvestre (Fig. 18). Por ello pensamos que el cambio que produce es solo a nivel del sitio activo, el que pudiera desorganizarse en parte debido a que la sustitución de la cadena lateral de K479 por un grupo metilo lleva a la pérdida del puente de hidrógeno que su grupo ϵ -amino hace con un carbonilo de la cadena principal del asa a la que pertenece D459, lo que a su vez puede llevar al movimiento de esta asa y a un cambio de posición de D459, afectando así las interacciones que este residuo hace con varios de los sustratos fisiológicos de *PaPauC* (ver más adelante). D459 podría salirse del sitio activo dirigiéndose e interaccionando con T303 y cambiando así la geometría del sitio activo. A este respecto es interesante que las enzimas arriba mencionadas que poseen un aspártico y una asparagina en la posición de D459 no poseen un residuo de lisina en la posición de K479 lo que permite que el asa donde está la asparagina esté movida y permita su interacción con la treonina equivalente a T303 (Fig. 21). También la sustitución de K479 por una alanina podría desestabilizar la conformación nativa

de W176, con cuyo anillo aromático el grupo ϵ -amino de K479 forma una interacción catión- π (Fig. 16). Esto último tendría un efecto dominó sobre la conformación nativa de F467, que además de participar en la unión de muchos de los aminoaldehídos que son sustrato de *PaPauC* parece ser importante para la catálisis, como ya se ha mencionado. Y una mayor movilidad de W176 y F467 en ausencia de K479 podría explicar una mayor exposición de estos residuos al medio y la mayor interacción con el fluoróforo observada a bajas temperaturas en la variante K479A en los experimentos de fluorimetría diferencial de barrido. Además, pareciera que el desorden que proponemos que provoca el cambio de K479 por alanina hace que se dé un cambio en el paso limitante de la velocidad en la reacción con todos los aminoaldehídos, de manera que este sea el mismo y mucho más lento que lo es en la enzima silvestre. Esta desorganización parece ser parcialmente recuperada por los grupos amino, trimetilamino o guanidino de los aldehídos APAL, ABAL, TMABAL y GdBAL, pero no por los aldehídos alifáticos como el PAL o que en lugar del grupo amino o guanidino con carga poseen un grupo amida en esta región como es el caso de los aldehídos glutamilados. Esto es consistente con que estos grupos interactúan con D459, W176 y F467, como se verá más adelante. Es interesante además que en la única otra estructura cristalográfica reportada de un ortólogo de *PaPauC*—la de la enzima de *Burkholderia* (PDB 4LIH)—se mantiene la posición y las interacciones de K479. Por el contrario, en la ALDH2 de humano esta interacción no puede darse porque tiene un residuo neutro de leucina L477 en lugar de la lisina K479 y por lo tanto las asas están movidas respecto a la enzima silvestre lo que provoca que la cadena lateral del aspartato equivalente a D459 en *PaPauC* (Fig. 23) esté fuera del sitio activo, como se mencionó. Esto también ocurre en la enzima ALDH1A2 que tiene una metionina en el lugar equivalente a K479.

VIII.5.2. Saturación por APAL de las variantes de *PaPauC*

En la Fig. 22 y Tabla 7 se puede observar que todos los cambios realizados disminuyeron la k_{cat} y k_{cat}/K_m por APAL y, a excepción de la mutante D459A, que aumenta su K_m .

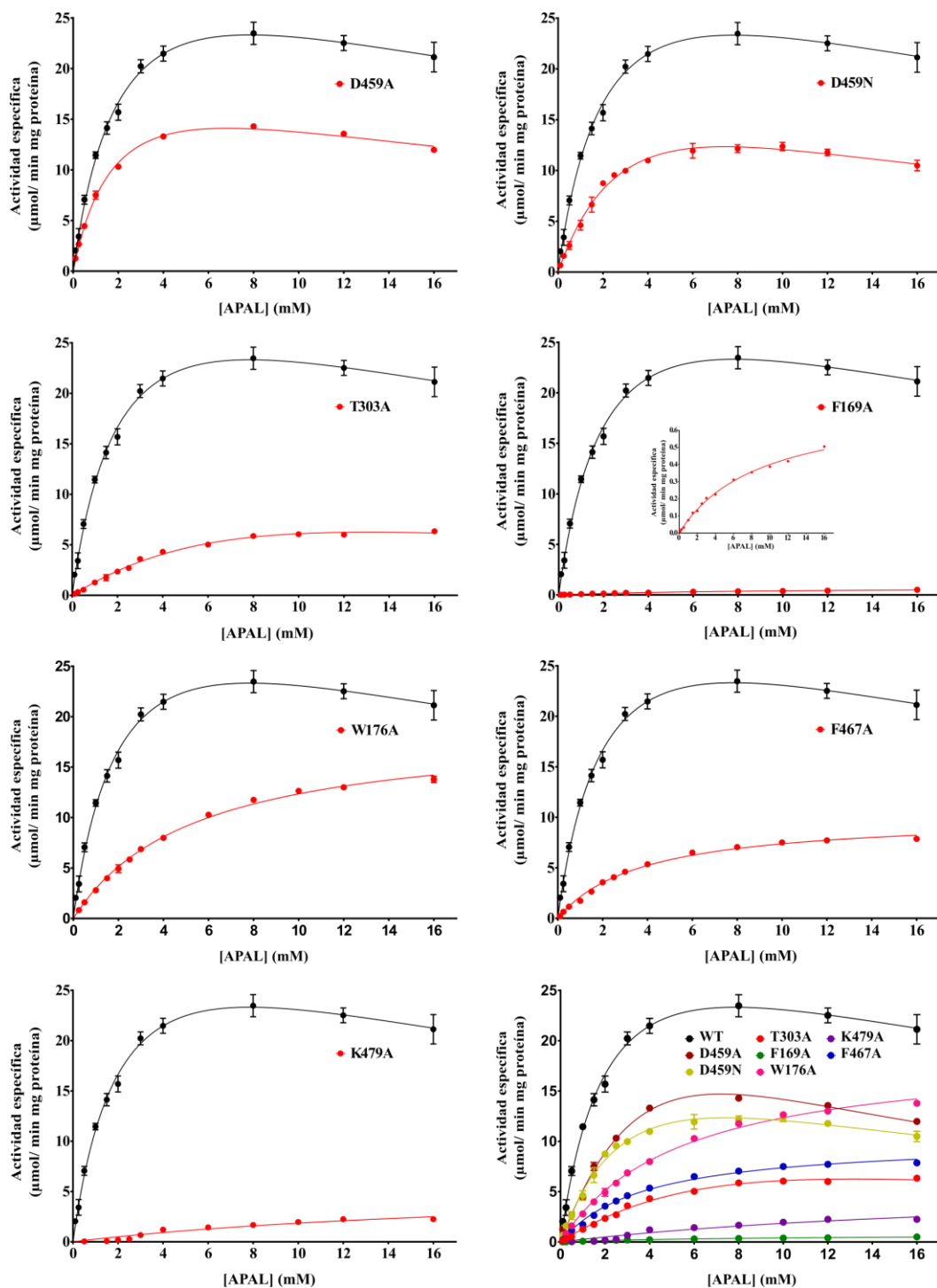


Fig. 22. Curvas de saturación con APAL de las diferentes variantes de *PaPauC*. En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores de velocidad inicial obtenidos en al menos dos experimentos independientes; las líneas dibujadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o la ecuación que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), como resultó apropiado. Las líneas verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos experimentales. Los

puntos negros y sus respectivas curvas corresponden a los datos obtenidos con la enzima silvestre y mostrados antes en la Fig. 14. En el panel correspondientes a la variante F169A se incluye un inserto para mostrar más claramente la saturación con este aldehído. Con fines comparativos, en el último panel se muestran todas las curvas de saturación de las enzimas variantes y de la silvestre.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de las enzimas *PaPauC* silvestre y variantes usando APAL como sustrato. Las velocidades iniciales se midieron a 30 °C, pH 8.0 y 0.6 mM de NAD⁺. Los parámetros cinéticos se estimaron por el ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o a la ecuación de inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), según fuera apropiado. V_{max} está dada en U/mg proteína, k_{cat} en s⁻¹, K_m y K_{IS} en mM y k_{cat}/K_m , en M⁻¹s⁻¹ × 10⁴. ND, no determinado. NA, no aplica.

Enzima	WT	D459A	D459N	T303A	F169A	W176A	F467A	K479A
Parámetros cinéticos								
V_{max}	37 ± 3	22.5 ± 1.1	14 ± 2	19 ± 4	0.76 ± 0.03	19.0 ± 0.3	10.0 ± 0.2	6 ± 2
k_{cat}	33 ± 3	20 ± 1	12 ± 2	17 ± 3	0.7 ± 0.03	16.8 ± 0.3	9.0 ± 0.2	5 ± 2
K_m	2.4 ± 0.4	2.0 ± 0.2	5 ± 1	14 ± 4	9 ± 1	5.4 ± 0.2	3.8 ± 0.2	21 ± 12
k_{cat}/K_m	1.4 ± 0.3	1.0 ± 0.1	0.24 ± 0.06	0.12 ± 0.04	0.008 ± 0.001	0.31 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.024 ± 0.016
$V_{max\ inh}$	14 ± 0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K_{IS}	10 ± 3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

De acuerdo con las simulaciones de acoplamiento molecular con APAL realizadas manualmente (Fig. 17C), los residuos que parecen importantes para determinar la especificidad de la enzima por este aldehído son T303, cuyo grupo hidroxilo de su cadena lateral podría hacer puentes de H con el grupo amino del APAL, y los residuos aromáticos W176 y F169 con los que podría hacer interacciones catión- π . El grupo amino quedó demasiado lejos para hacer puente de hidrógeno o enlace iónico con el grupo carboxilo de D459. Consistente con esto, la saturación de la variante D459A por APAL indicó que este residuo no participa de forma importante en la unión de este aldehído, ya que su eliminación disminuye la k_{cat} y k_{cat}/K_m por un factor pequeño. Sin embargo, si se compara con el efecto positivo que tenía la sustitución del aspartato por una alanina en la saturación con PAL, sí parece que el grupo carboxilo contribuye algo a la unión eficiente de APAL, probablemente por la carga negativa de su grupo carboxilo. Al sustituir este grupo carboxilo por un grupo amida sin carga se observó un efecto negativo mayor sobre k_{cat} (que disminuyó 2.6 veces), k_{cat}/K_m (que disminuyó casi 6 veces) y K_m (que aumentó 2 veces). Estos resultados de nuevo sugieren que la cadena lateral de la asparagina adopta una conformación diferente a la que adopta la del aspártico en la enzima vacía, y que en esta conformación pudiera estorbar al APAL para unirse en la posición catalíticamente más eficiente que adopta en la enzima silvestre. No parecen estar involucrados en este efecto ni la pérdida de la carga negativa ni la posibilidad de que el APAL forme un puente de hidrógeno con el grupo amida, ya que este efecto de una asparagina en esta posición es similar al que observamos sobre la cinética de la enzima con PAL.

La variante T303A mostró una reducción en k_{cat} un poco mayor a la de D459A (aprox. 2 veces), una disminución aun mayor en la k_{cat}/K_m (de aprox. 12 veces) y un aumento también mayor en K_m (de aproximadamente seis veces), lo que sugiere que se pierde un puente de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de T303 y el amino del APAL importante para la unión de este aldehído.

En cuanto a las variantes en las que se cambiaron los residuos aromáticos por alanina, los cambios más importantes en k_{cat} (de casi 50 veces), de k_{cat}/K_m (135 veces) y de K_m (de casi cuatro veces) se observaron en la variante F169A. Los cambios en k_{cat} , similares a los observados con PAL, apoyan nuestra interpretación de que el eliminar el anillo aromático en esta posición tiene efectos muy importantes y similares para la oxidación de todos los

aldehídos porque este residuo juega un papel importante en el mecanismo de catálisis de las ALDHs en general. Pero el cambio en K_m (APAL) fue mayor que el de K_m (PAL), lo que sugiere una participación de este residuo en la unión de APAL. Esto es consistente con el resultado del acoplamiento manual mostrado en la Fig. 17C que sugiere una interacción catión- π ente APAL y F169. La variante F467A también mostró una reducción importante en los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m , pero parecidos a los observados con PAL como sustrato. En el caso de W176A estos cambios fueron menores que los observados con PAL, lo que sugiere que la presencia del grupo amino en el aldehído puede hacer otras interacciones que parcialmente compensan la eliminación de este anillo aromático, probablemente porque puede estar haciendo interacciones catión- π con F467, contribuyendo así a su estabilización en la conformación catalíticamente correcta de este residuo. Esta interpretación es consistente con que la variante F467A muestra efectos negativos mayores en los valores de k_{cat}/K_m con APAL como sustrato que con PAL. El valor de K_m (APAL) incrementado 2 veces en la variante W176A sugiere la participación de este residuo en la unión del aldehído como lo sugiere el resultado del acoplamiento manual (Fig. 17C).

Finalmente se observó una disminución importante en los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m de la variante K479A y un incremento de aproximadamente diez veces en la K_m , a pesar de que este residuo no interacciona con el APAL. Como se mencionó anteriormente esto probablemente se debe a que este cambio parece tener un efecto estructural en el que el sitio activo parcialmente se desorganiza, como ya discutimos en el apartado de la saturación por PAL. Pero estos cambios fueron menores que los observados con PAL probablemente por la interacción de APAL con W176, que lo estabiliza en su conformación correcta.

Resumiendo, nuestros resultados cinéticos indican que el residuo que juega el papel más importante en la unión de APAL es T303, aunque D459 y F467 también contribuyen en menor medida a esta unión.

VIII.5.3 Saturación por GluAPAL de las variantes de PaPauC

Los resultados de acoplamiento molecular sugirieron que el carbonilo del enlace amida del GluAPAL está haciendo puente de H con el grupo hidroxilo de la T303, mientras que no interacciona con el grupo carboxilo de D459, y que el grupo α -carboxilo puede formar un enlace iónico con el ϵ -amino de K479 y está a una distancia y orientación adecuadas para hacer una interacción anión- π con el anillo aromático de W176. Esta simulación no predijo ninguna interacción del grupo α -amino del GluAPAL con la proteína (Fig. 17F). Los resultados de la caracterización cinética de las variantes con este aldehído se muestran en la Fig. 23 y Tabla 8.

Una ligera disminución de la k_{cat} y la k_{cat}/K_m para GluAPAL en la variante D459A nos indica que el grupo carboxilo ayuda de alguna forma a la unión del aldehído formando un complejo enzima-aldehído catalíticamente competente. De nuevo observamos un efecto negativo mayor sobre los valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m en la variante D459N que en la D459A, lo que podría explicarse por las mismas razones que expusimos para el caso de la cinética con APAL; es decir, porque esta cadena lateral de la asparagina adopte una conformación que estorba la unión catalíticamente más efectiva. El efecto sobre k_{cat} es mayor que sobre k_{cat}/K_m dando como consecuencia el que la K_m incluso sea más baja que en la enzima silvestre. Ello sugiere que esta sustitución afecta más a alguno de los pasos catalíticos que a la unión del sustrato, que podría estar relativamente favorecida si se forma el mencionado puente de hidrógeno. De hecho, la reducción en k_{cat} observada en esta variante (aproximadamente de seis veces) fue la mayor de todas las variantes (con la excepción de F169A y K479A que creemos que son casos particulares por las razones anteriormente expuestas), seguida de las variantes F467A, W176A y T303A (en orden de mayor a menor efecto).

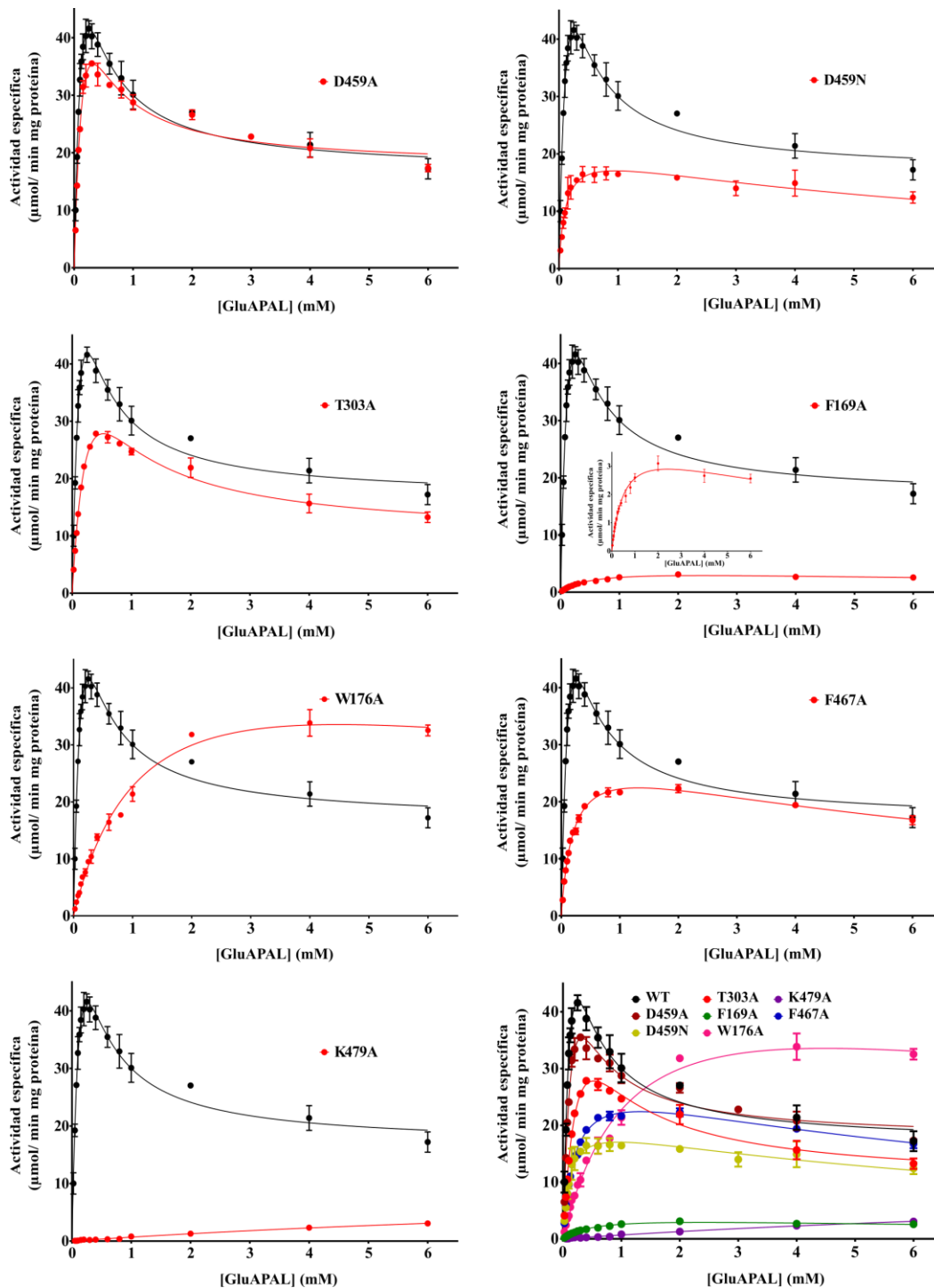


Fig. 23. Curvas de saturación con GluAPAL de las diferentes variantes de *PaPauC*. En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores de velocidad inicial obtenidos en al menos dos experimentos independientes; las líneas dibujadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o la ecuación que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), como resultó apropiado. Las líneas verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos experimentales. Los

puntos negros y sus respectivas curvas corresponden a los datos obtenidos con la enzima silvestre y mostrados antes en la Fig 14. En el panel correspondiente a la variante F169A se incluye un inserto para mostrar más claramente la saturación con este aldehído. Con fines comparativos, en el último panel se muestran todas las curvas de saturación de las enzimas variantes y de la silvestre.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de las enzimas *PaPauC* silvestre y variantes usando GluAPAL como sustrato. Las velocidades iniciales se midieron a 30 °C, pH 8.0 y 0.6 mM de NAD⁺. Los parámetros cinéticos se estimaron por el ajuste por regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o a la ecuación de inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), según fuera apropiado. V_{max} está dada en U/mg proteína, k_{cat} en s⁻¹, K_m y K_{IS} en mM y k_{cat}/K_m , en M⁻¹s⁻¹ × 10⁴. ND, no determinado. NA, no aplica.

Enzima	WT	D459A	D459N	T303A	F169A	W176A	F467A	K479A
Parámetros cinéticos								
V_{max}	123 ± 19	99 ± 24	27 ± 3	70 ± 12	4.2 ± 0.3	52 ± 4	29 ± 1	11 ± 2
k_{cat}	109 ± 17	88 ± 21	24 ± 3	62 ± 11	3.7 ± 0.3	46 ± 4	26 ± 1	10 ± 2
K_m	0.26 ± 0.05	0.3 ± 0.1	0.18 ± 0.04	0.4 ± 0.1	0.54 ± 0.06	1.2 ± 0.1	0.20 ± 0.01	14 ± 4
k_{cat}/K_m	42 ± 8	29 ± 12	13 ± 3	15 ± 5	0.7 ± 0.1	3.8 ± 0.4	13 ± 8	0.07 ± 0.02
$V_{max\ inh}$	16 ± 1	17 ± 1	12 ± 1	10 ± 1	NA	NA	NA	NA
K_{IS}	0.16 ± 0.04	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2	NA	NA	NA	NA

Por lo que respecta a la variante T303A, la pérdida del posible puente de hidrógeno entre el carbonilo del enlace amida del GluAPAL y el hidroxilo de T303 explicaría el efecto negativo sobre los tres parámetros cinéticos, porque esta pérdida no solo debilitaría la unión, sino que además dificultaría el que el sustrato adoptase la posición catalíticamente más idónea.

En cuanto a las variantes en los residuos aromáticos, en todos los casos la constante de especificidad k_{cat}/K_m disminuyó, particularmente en la variante F169A (que es 60 veces menor que en la enzima silvestre), probablemente por las razones ya discutidas. Pero también hubo una disminución importante en la k_{cat}/K_m de la variante W176A (11 veces) y un aumento de K_m (unas 5 veces), indicando la importancia de este residuo para la unión del GluAPAL. Este efecto puede deberse a que en W176A se haya eliminado la interacción del tipo anión- π con el α -carboxilo del GluAPAL sugerida por el acoplamiento molecular. También se redujo la k_{cat} en esta mutante (unas 11 veces), pero en un grado menor que el observado para PAL, lo que sugiere que GluAPAL pudiera estabilizar en algún grado el sitio activo en ausencia del anillo de W176, posiblemente por su interacción con K479 también sugerida por el acoplamiento molecular. Aunque en menor magnitud, la eliminación del anillo de F467 también tuvo efectos negativos en la saturación por este aldehído, ya que se redujo la k_{cat} y la k_{cat}/K_m unas 3 o 4 veces, aunque no hubo cambios en K_m , lo que aunado a que los cambios observados fueron de magnitud similar a los observados con PAL como sustrato, sugiere que estos efectos se deben a una reducción en la proporción de tiolato de la cisteína catalítica, como discutimos en el caso del PAL.

Finalmente, el aumento en la K_m de 54 veces observada en la cinética de saturación de la variante K479A con GluAPAL, mientras que en la saturación con PAL no había cambios en K_m , sugiere fuertemente que la interacción entre el grupo carboxilo de GluAPAL y el ϵ -amino de K479 mostrada en el acoplamiento molecular sí se da, y que es muy importante para la unión de este aldehído. El valor de k_{cat} disminuye en esta variante (unas 11 veces) pero menos que la disminución de 80 veces con APAL, lo que sugiere que la unión de GluAPAL también estabiliza en cierto grado la conformación nativa del sitio activo cuando la cadena lateral de K479 es sustituida por una alanina. La gran disminución en el valor de k_{cat}/K_m (600 veces) casi diez veces mayor que la disminución observada con APAL

(de 65 veces) claramente muestra el papel crítico de este residuo para una catálisis eficiente de GluAPAL.

En conclusión, nuestros resultados cinéticos indican que en la unión del GluAPAL participa de forma muy importante K479, seguido de W176 y en menor medida T303. El que sean varios los residuos involucrados en mayor o menor grado en la unión de GluAPAL era de esperarse, dado su tamaño y el que posee varios grupos funcionales capaces de establecer diferentes tipos de enlaces con residuos del sitio activo. Probablemente este mayor número de interacciones, y el que parecen ser las adecuadas para el correcto posicionamiento de este aldehído para los pasos catalíticos, es lo que explica los valores tan altos de k_{cat} y k_{cat}/K_m de este sustrato, sobre todo cuando se le compara con APAL. Los parámetros cinéticos con GluAPAL y APAL son muy parecidos en la mutante K479A, aunque aún son mejores para GluAPAL (Tablas 7 y 8), lo que soporta la importancia crítica de ese residuo en la unión eficiente de GluAPAL. Por el contrario, la sustitución por alanina de W176 o T303 aún produjo variantes catalíticamente mucho más eficientes que la enzima silvestre con APAL. La K479 parece haber sido seleccionada en un proceso evolutivo de optimización del sitio activo de esta enzima para llevar a cabo muy eficientemente la oxidación de este importante sustrato fisiológico.

VIII.5.4. Saturación por ABAL de las variantes de PaPauC

En la simulación de acoplamiento molecular, el grupo amino de ABAL mostró una interacción de puente de H con T303 y una interacción iónica o de puente de H con D459 (Fig. 17D). La saturación con este aldehído de las variantes en las que estos residuos se había cambiado confirmó dichas interacciones e indicó que existen otras interacciones de tipo catión- π con los residuos F169 y W176, por lo que llevamos a cabo acoplamientos en forma manual para confirmarlas o rechazarlas. Efectivamente, encontramos que estas interacciones son posibles como se mostró anteriormente (Fig. 17E). Los resultados de los experimentos cinéticos se muestran en la Fig. 24 y en la Tabla 9.

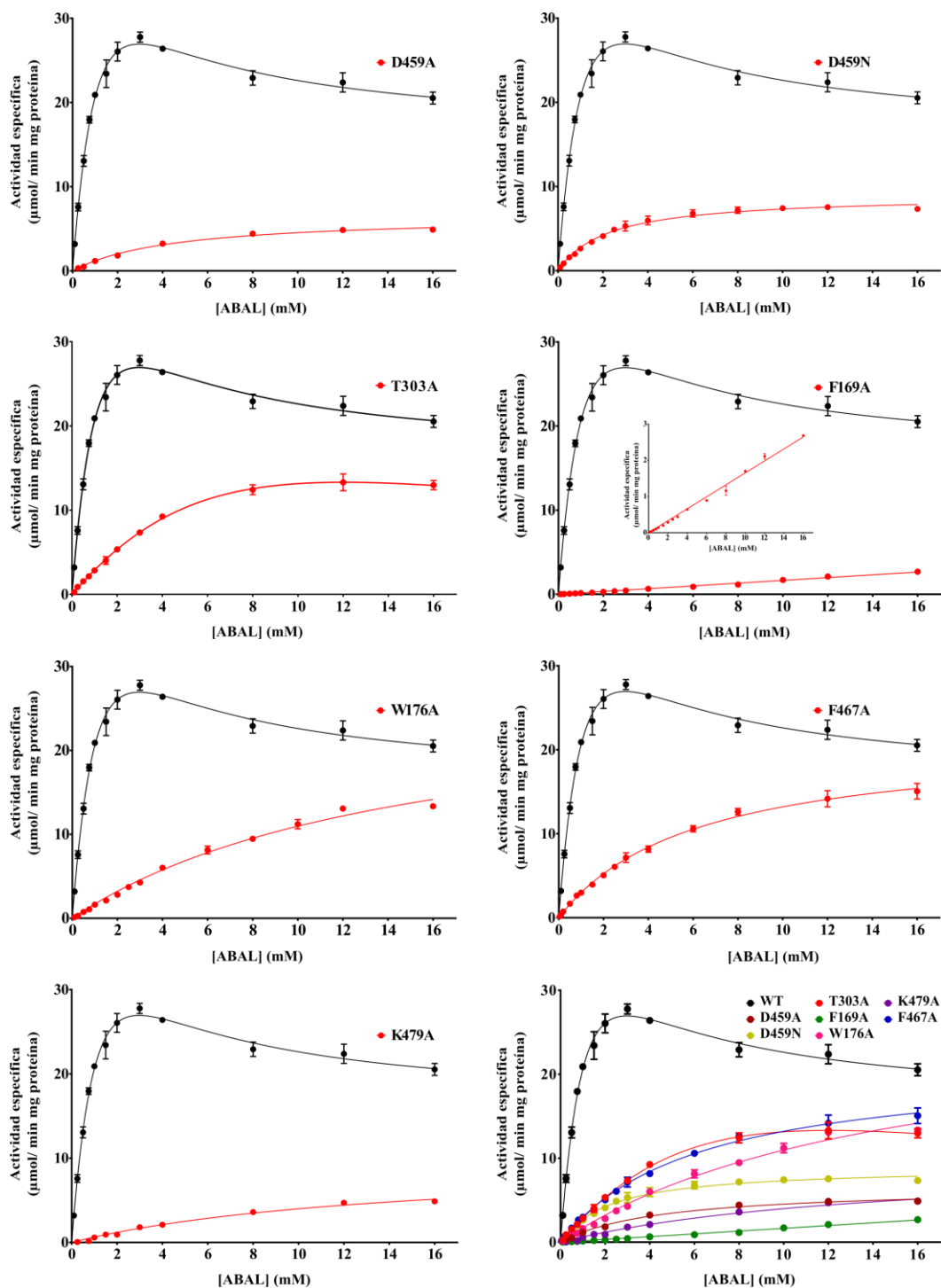


Fig. 24. Curvas de saturación con ABAL de las diferentes variantes de *PaPauC*. En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores de velocidad inicial obtenidos en al menos dos experimentos independientes; las líneas dibujadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o la ecuación que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), como resultó apropiado. Las líneas verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos experimentales. Los

puntos negros y sus respectivas curvas corresponden a los datos obtenidos con la enzima silvestre y mostrados antes en la Fig 14. En los paneles correspondientes a la variante F169A se incluye un inserto para mostrar más claramente la saturación con este aldehído. Con fines comparativos, en el último panel se muestran todas las curvas de saturación de las enzimas variantes y de la silvestre.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de las enzimas *PaPauC* silvestre y variantes usando ABAL como sustrato. Las velocidades iniciales se midieron a 30 °C, pH 8.0 y 0.6 mM de NAD⁺. Los parámetros cinéticos se estimaron por el ajuste de regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o a la ecuación de inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), según fuera apropiado. V_{max} está dada en U/mg proteína, k_{cat} en s⁻¹, K_m y K_{IS} en mM y k_{cat}/K_m , en M⁻¹s⁻¹ × 10⁴. ND, no determinado. NA, no aplica. *Este valor se calculó como la pendiente de la recta observada en el intervalo de concentración del aldehído usado en el experimento de saturación.

Enzima	WT	D459A	D459N	T303A	F169A	W176A	F467A	K479A
Parámetros cinéticos								
V_{max}	61 ± 8	6.6 ± 0.3	9.0 ± 0.2	47 ± 10	ND	28 ± 1	21.0 ± 0.5	10 ± 1
K_{cat}	54 ± 7	5.8 ± 0.3	8 ± 0.2	42 ± 9	ND	25 ± 1	19 ± 0.4	9 ± 1
K_m	1.8 ± 0.4	4.5 ± 0.5	2.2 ± 0.1	15 ± 4	ND	15 ± 1	6.1 ± 0.3	14 ± 3
k_{cat}/K_m	3.0 ± 0.8	0.13 ± 0.02	0.36 ± 0.02	0.28 ± 0.1	0.013*	0.17 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.064 ± 0.015
$V_{max\ inh}$	16 ± 1	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA
K_{IS}	1.8 ± 0.7	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA

Todas las variantes disminuyeron la k_{cat}/K_m , en especial la F169 (230 veces), seguida de D459A (23 veces), W176A (casi 20 veces), T303A (11 veces), F467A (10 veces) y D459N (8 veces). En el caso de la variante F169 la disminución en k_{cat}/K_m es más de dos veces mayor que la observada con PAL y el efecto sobre K_m es tan importante que no se observaron indicios de saturación aun cuando el sustrato se aumentó hasta una concentración de 16 mM, lo que impidió determinar los valores de V_{max} , k_{cat} y K_m . El valor de k_{cat}/K_m hubo que estimarlo como la pendiente de la recta observada en el gráfico de velocidad inicial frente a concentración de sustrato en el intervalo de 0 a 16 mM. Este importante efecto negativo sugiere que F169 no solo tiene el papel catalítico que suponemos tiene en las ALDHs en general, sino que en PaPauC también participa en la unión del ABAL, por medio de interacciones catión- π , como lo sugiere el acoplamiento manual. También en la variante W176A se observó un incremento importante en la K_m (de ocho veces), pero en este caso si pudo determinarse su cinética de saturación dado que el efecto sobre k_{cat} fue pequeño (de unas dos veces). La disminución de 18 veces en la k_{cat}/K_m en la variante W176A fue aproximadamente dos veces mayor que el observado para PAL, confirmando el papel de este residuo en la unión de ABAL. El cambio mayor en k_{cat} se observó en D459A (aprox. diez veces) y en D459N (casi 7 veces), lo que indica la importancia de D459 para la unión catalíticamente eficiente de ABAL. La disminución de k_{cat} en F467A (3 veces) de nuevo sugiere un papel en la catálisis de este residuo, ya que no participa en la unión del ABAL, y las disminuciones en los valores de k_{cat} de las variantes W176A (2 veces) y T303A (1.3 veces) fueron pequeños, lo que sugiere que el aldehído puede adoptar posiciones catalíticamente apropiadas en ausencia de las interacciones que hace con estos residuos, probablemente porque las interacciones que hace con D459 y con F169 las compensan. Finalmente, en cuanto a la cinética de saturación de la variante K479A, los valores observados en k_{cat} , K_m y k_{cat}/K_m están en el mismo orden de magnitud que los observados con el resto de los aldehídos a excepción del PAL, con el que se obtuvo un valor de k_{cat} mucho menor. Esto sugiere que la unión de cualquiera de los aldehídos con un grupo cargado positivamente contrarresta de algún modo y en un cierto grado el cambio que ocurre en el sitio activo por la pérdida del grupo ϵ -amino de K479 que tiene un efecto tan importante en la catálisis del PAL, como ya discutimos.

En resumen, nuestros resultados cinéticos sugieren que, a diferencia del APAL, el residuo más importante para la unión catalíticamente competente del ABAL es D459, de acuerdo con lo predicho en las simulaciones de acoplamiento molecular (Fig. 17D), y que también participa T303. Además, sugieren que el ABAL puede unirse en el sitio activo en forma productiva interaccionando con W176 y F169, lo que es consistente con los resultados de los acoplamientos manuales que muestran que su grupo amino puede hacer interacciones catión- π con W176 y F169, colocándose en medio de los dos anillos aromáticos de estos residuos (Fig. 17E).

VIII.5.5. Saturación por GluABAL de las variantes de PaPauC

En el caso del GluABAL los resultados de las simulaciones de acoplamiento molecular indicaron la formación de un puente de H entre el carbonilo del grupo amida con el grupo hidroxilo de T303. También muestran un puente salino entre el grupo α -carboxilo del glutamil con el grupo ϵ -amino de la cadena lateral de la K479 y una interacción anión- π entre este carboxilo y el anillo aromático de W176. Los resultados de la caracterización cinética de las variantes usando este aldehído como sustrato se muestran en a Fig. 25 y la Tabla 10.

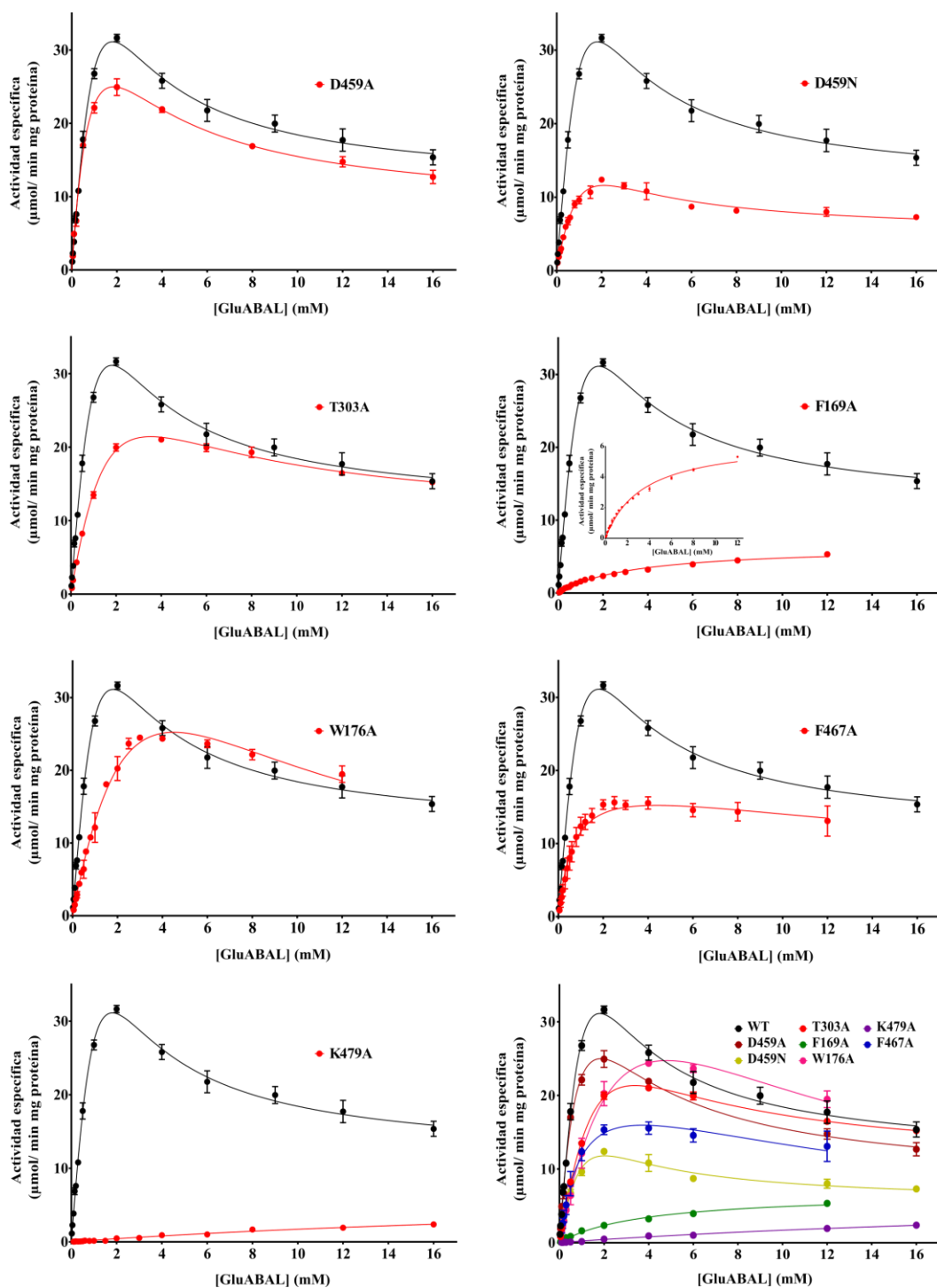


Fig. 25. Curvas de saturación con GluABAL de las diferentes variantes de *PaPauC*. En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores de velocidad inicial obtenidos en al menos dos experimentos independientes; las líneas dibujadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o la ecuación que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), como resultó apropiado. Las líneas verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos experimentales. Los

puntos negros y sus respectivas curvas corresponden a los datos obtenidos con la enzima silvestre y mostrados antes en la Fig 14. En el panel correspondientes a la variante F169A se incluye un inserto para mostrar más claramente la saturación con este aldehído. Con fines comparativos, en el último panel se muestran todas las curvas de saturación de las enzimas variantes y de la silvestre.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de las enzimas *PaPauC* silvestre y variantes usando GluABAL como sustrato. Las velocidades iniciales se midieron a 30 °C, pH 8.0 y 0.6 mM de NAD⁺. Los parámetros cinéticos se estimaron por el ajuste de regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o a la ecuación de inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), según fuera apropiado. V_{max} está dada en U/mg proteína, k_{cat} en s⁻¹, K_m y K_{IS} en mM y k_{cat}/K_m , en M⁻¹s⁻¹ × 10⁴. ND, no determinado. NA, no aplica.

Enzima	WT	D459A	D459N	T303A	F169A	W176A	F467A	K479A
Parámetros cinéticos								
V_{max}	132 ± 43	61 ± 14	32 ± 7	63 ± 11	6.4 ± 0.2	83 ± 10	20 ± 0	7 ± 1
k_{cat}	117 ± 38	54 ± 12	28 ± 6	56 ± 10	5.7 ± 0.2	73 ± 9	18 ± 0	6 ± 1
K_m	3 ± 1	1.3 ± 0.4	1.8 ± 0.5	3.4 ± 0.8	3.4 ± 0.2	5 ± 1	0.70 ± 0.03	31 ± 8
k_{cat}/K_m	3.7 ± 1.0	4 ± 2	1.6 ± 0.6	1.6 ± 0.5	0.17 ± 0.01	1.5 ± 0.3	2.6 ± 0.1	0.019 ± 0.006
$V_{max\ inh}$	10 ± 1	8 ± 2	5 ± 1	10 ± 1	NA	NA	NA	NA
K_{IS}	0.8 ± 0.4	2 ± 1	1.4 ± 0.7	2 ± 1	NA	NA	NA	NA

La variante D459A mostró una disminución de aprox. dos veces en k_{cat} , pero también una disminución parecida en la K_m , por lo que el valor de k_{cat}/K_m no cambió, lo que es consistente con que no se observó la interacción de GluABAL con este residuo en la simulación de acoplamiento molecular. Los cambios pequeños en k_{cat} y K_m son consistentes con que la cadena lateral de D459 estorba algo para la unión del aldehído, pero que una vez que esta ocurre ayuda a que sea catalíticamente más competente. En la variante D459N la disminución en k_{cat} es mayor (de cuatro veces), probablemente debido a la razón antes expuesta de que la conformación de la N459 es diferente a la de D459 y en este caso ayude más para que una vez unido el aldehído adopte una posición catalíticamente eficiente. El cambio de T303 por una alanina produjo una disminución en la k_{cat} similar a la observada en la variante D459A—que puede explicarse por la misma razón—, pero un aumento mayor en K_m , lo que refleja la contribución a la unión del aldehído del puente de hidrógeno que GluABAL hace con este residuo, como sugirió el acoplamiento molecular. En la variante F467 la k_{cat} disminuyó más de seis veces, lo que probablemente es achacable al efecto inespecífico que proponemos que este residuo tiene sobre la catálisis sumado a que la presencia del anillo por efectos estéricos ayude a posicionar correctamente al aldehído. La también importante disminución en la K_m (de aprox. 4 veces) apoya la existencia de estos efectos estéricos, sugiriendo que la sustitución del anillo por un grupo metileno mucho más pequeño agranda la cavidad del sitio facilitando así la unión del GluABAL sin que esta sustitución tenga un efecto negativo sobre la unión ya que en la enzima silvestre F467 no interacciona con el aldehído, como lo indicó el acoplamiento molecular (Fig. 17G). La disminución en k_{cat}/K_m para GluABAL en esta variante fue pequeña y no significativa (de unas 1.5 veces). En la variante W176A, hubo una pequeña disminución en k_{cat} (de unas 1.6 veces), un aumento de magnitud similar en K_m y una disminución de 2.5 veces en k_{cat}/K_m . Estos resultados apoyan el que se esté dando la interacción anión- π de este residuo con el grupo α -carboxilo del glutamil sugerida por el acoplamiento molecular, que en algo contribuye a la unión y al posicionamiento correcto del aldehído. El enlace iónico de este grupo carboxilo con el grupo ϵ -amino de K479 sí parece ser muy importante para la unión correcta del GluABAL porque en esta variante la K_m aumentó diez veces—lo que no se debe a la desorganización del sitio activo que proponemos ocurre en esta variante ya que la K_m (APAL) no cambió. La disminución en la k_{cat} (19 veces) sí podría explicarse en gran parte

por esta desorganización del sitio activo, aunque esta disminución que es la mitad de la observada con APAL sugiere que la unión de GluABAL en parte corrige esta desorganización, quizás porque al haber más espacio en el sitio activo, y no existir la interacción del α -carboxilo con K479, este grupo puede colocarse correctamente para hacer una interacción anion- π con W176.

Que GluABAL adopte una posición en el sitio activo de esta variante diferente a la que adopta en la enzima silvestre lo sugiere además el valor de k_{cat}/K_m que disminuyó 185 veces con respecto al valor de la enzima silvestre, una disminución bastante mayor que la observada para APAL. De manera similar, vimos que para GluAPAL, K479 es el residuo crítico para la eficiente oxidación de GluABAL por *PaPauC*. En ausencia de K479 las diferencias en los valores de los parámetros cinéticos de la enzima silvestre para GluAPAL y GluABAL disminuyen, en particular la eficiencia catalítica que en la enzima silvestre es una diez veces superior para GluAPAL que para GluABAL y que en la variante K479A es solo tres veces. Y en esta variante GluABAL es un peor sustrato que ABAL, siendo que en la enzima silvestre era ligeramente un mejor sustrato.

En cuanto a los cambios en el valor de k_{cat} , con excepción de los casos particulares de las variantes F169A y K479A, la disminución mayor en k_{cat} se observó en F467A (de 6.6 veces). Esta disminución importante en k_{cat} unida a una disminución aproximadamente igual en K_m y a que k_{cat}/K_m cambia muy poco podría explicarse si en ausencia del anillo aromático de F467 ocurre unión no productiva del aldehído, que de ser así indicaría una contribución de F467, quizás de tipo estérico, a la unión correcta del aldehído para que se lleve a cabo la catálisis. La misma explicación podría darse a la disminución prácticamente igual de k_{cat} y K_m (2.3-2.4 veces) en la variante D459A: la cadena lateral de D459 ayudaría de alguna manera a que el aldehído se una en forma catalíticamente eficiente y no ocurra la unión no productiva que tendría lugar cuando es sustituida por un metilo. La disminución de k_{cat} en la W176A (de aprox. 1.7 veces) no se acompaña de una disminución similar en la K_m , por el contrario, esta aumenta aprox. 1.7 veces, sugiriendo que este residuo sí participa en la unión del GluABAL ayudando a que se alcance una unión óptima para la catálisis.

Resumiendo, nuestros resultados sugieren que GluABAL, al igual que GluAPAL, interacciona con varios residuos del sitio activo, pero más débilmente de lo que lo hace GluAPAL, siendo su interacción con K479 la más importante.

VIII.5.6. Saturación por GdBAL de las variantes de PaPauC

Las simulaciones de acoplamiento molecular hechas con este aldehído (Fig. 17H) mostraron que posiblemente se daban dos interacciones importantes con residuos del sitio activo: un puente de H o un enlace iónico entre el grupo guanidino del aldehído y el carboxilo de la cadena lateral de D459 y un puente de H entre el grupo guanidino del GdBAL y el hidroxilo de T303. Los resultados de la saturación con este aldehído de las variantes en las que estos residuos se cambiaron apoyó estas predicciones, particularmente la de la interacción con D459 puesto que la k_{cat}/K_m en la variante D459A disminuyó 145 veces aprox. Dado que la K_m aumentó 26 veces y la k_{cat} disminuyó unas 5 veces, pareciera que en ausencia de esta interacción fuerte no solo se dificulta en forma importante la unión del GdBAL sino que además cuando éste se une, su carbonilo no puede colocarse en forma óptima para la catálisis, lo que se refleja en una k_{cat}/K_m 145 veces menor que la de la enzima silvestre.

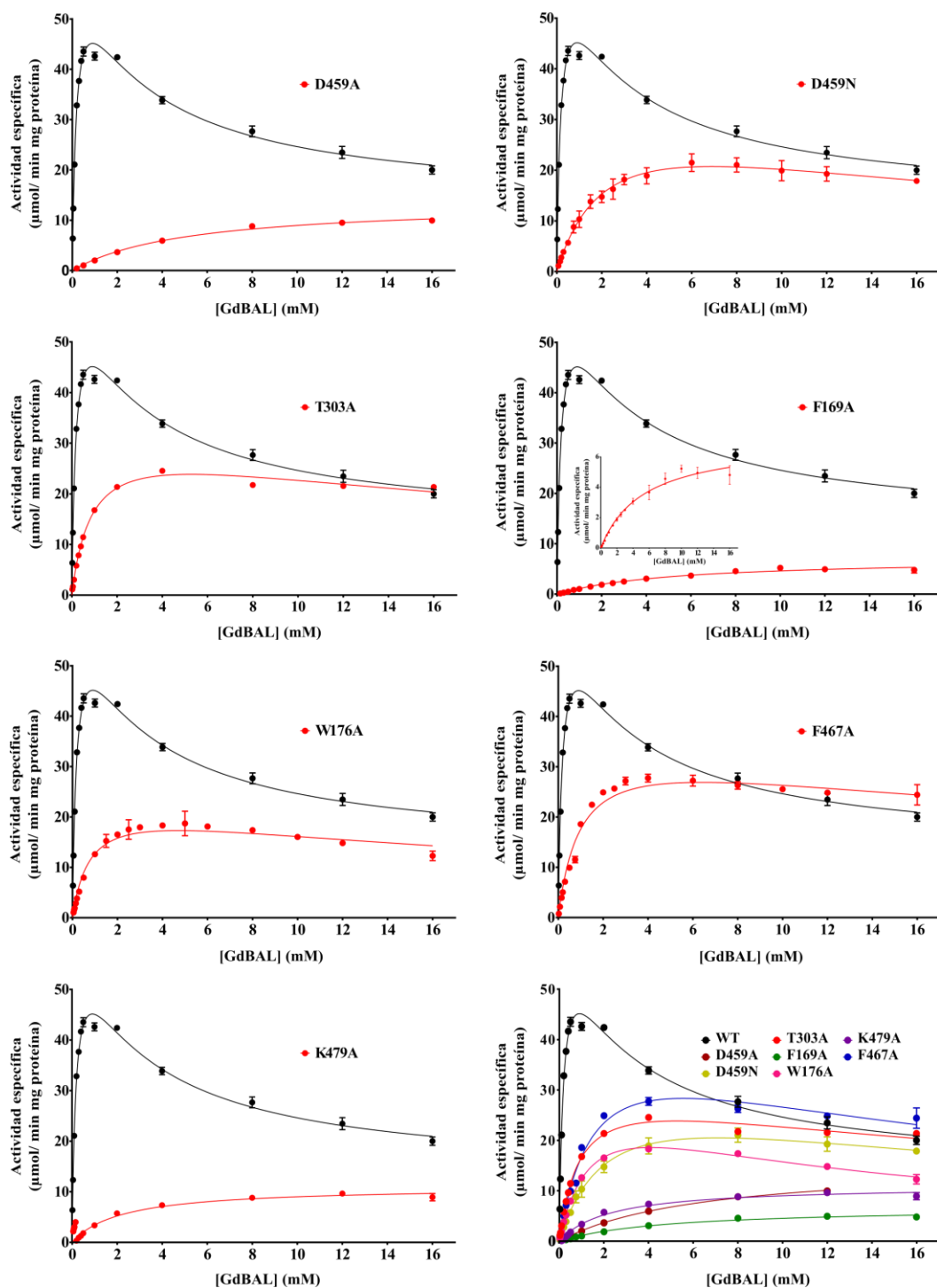


Fig. 26. Curvas de saturación con GdBAL de las diferentes variantes de *PaPauC*. En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores de velocidad inicial obtenidos en al menos dos experimentos independientes; las líneas dibujadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o la ecuación que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), como resultó apropiado. Las líneas verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos experimentales. Los

puntos negros y sus respectivas curvas corresponden a los datos obtenidos con la enzima silvestre y mostrados antes en la Fig 14. En el panel correspondiente a la variante F169A se incluye un inserto para mostrar más claramente la saturación con este aldehído. Con fines comparativos, en el último panel se muestran todas las curvas de saturación de las enzimas variantes y de la silvestre.

Tabla 11. Parámetros cinéticos de las enzimas *PaPauC* silvestre y variantes usando GdBAL como sustrato. Las velocidades iniciales se midieron a 30 °C, pH 8.0 y 0.6 mM de NAD⁺. Los parámetros cinéticos se estimaron por el ajuste de regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o a la ecuación de inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), según fuera apropiado. V_{max} está dada en U/mg proteína, k_{cat} en s⁻¹, K_m y K_{IS} en mM y k_{cat}/K_m , en M⁻¹s⁻¹ × 10⁴. ND, no determinado. NA, no aplica

Enzima	WT	D459A	D459N	T303A	F169A	W176A	F467A	K479A
Parámetros cinéticos								
V_{max}	65 ± 3	13.6 ± 0.4	35 ± 3	35 ± 3	7.1 ± 0.3	32 ± 1	65 ± 14	11.0 ± 0.4
k_{cat}	58 ± 3	12.0 ± 0.4	31 ± 3	31 ± 3	6 ± 0.3	28 ± 1	58 ± 12	9.7 ± 0.4
K_m	0.2 ± 0.0	5.2 ± 0.4	2.4 ± 0.3	1.1 ± 0.1	5.4 ± 0.5	1.5 ± 0.1	3 ± 1	2.2 ± 0.2
k_{cat}/K_m	29.0 ± 3.0	0.2 ± 0.0	1.3 ± 0.2	2.8 ± 0.3	0.1 ± 0.0	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.7	0.4 ± 0.0
$V_{max\ inh}$	13 ± 2	NA	NA	17 ± 2	NA	NA	20 ± 2	NA
K_{IS}	3 ± 1	NA	NA	5 ± 3	NA	NA	2 ± 1	NA

La sustitución de D459 por una asparagina disminuyó esta importante caída en la k_{cat}/K_m , que ya fue solo de 22 veces. La k_{cat} disminuyó aprox. 2 veces y la K_m aumentó 12 veces. Estos resultados sugieren que probablemente el grupo guanidino de GdBAL sí puede establecer un puente de H con el grupo amida de N459, pero que la fuerza de esta interacción es mucho menor que la de la interacción con el grupo carboxilo cargado del aspártico, y que de nuevo la unión no es la óptima para la catálisis. También se confirmó la formación del puente de H con el hidroxilo de T303, pero esta interacción contribuye menos a la unión del aldehído que la que hace D459, como lo indica el que la k_{cat}/K_m disminuyó un poco menos de 10 veces, la k_{cat} disminuyó aproximadamente 2 veces y la K_m aumentó 5 veces. Además, se evidenció la contribución de F467, puesto que la variante F467A presentó una disminución en k_{cat}/K_m de 15 veces, que refleja el aumento de 15 veces en la K_m , ya que el valor de k_{cat} no se modificó. Por tanto, en ausencia del anillo aromático de F467 se afecta bastante la unión, pero no la catálisis. En otras palabras, GdBAL sigue uniéndose en el modo en que lo hace en la enzima silvestre, probablemente por la contribución de D459 y T303. Igual disminución en k_{cat}/K_m se observó en la variante W176A (15 veces), pero a diferencia de F467A, la k_{cat} sí disminuyó (2 veces) y la K_m aumentó sólo 7.5 veces. Estos resultados sugieren que W176 también tiene una participación importante en la unión de GdBAL, probablemente por una interacción catión- π con el grupo guanidino que además ayuda en algo a la posición del aldehído correcta para la catálisis. El acoplamiento manual confirmó esta última interacción y mostró que el grupo guanidino sí podría colocarse entre los anillos de F169 y W176 haciendo interacciones catión- π con ambos residuos (Fig. 17I). Sin embargo, el grupo carbonilo del aldehído podría no colocarse en la mejor forma para que se llevara a cabo la catálisis, dando lugar a la disminución observada en k_{cat} . La variante F169A mostró una disminución en k_{cat} de 9 veces, mucho menor que las 40 veces que disminuyó con PAL, un aumento en K_m de 27 veces, mientras que con PAL la K_m disminuyó unas dos veces y una disminución en k_{cat}/K_m de aprox. 260 veces, cuatro veces mayor a la observada con PAL. Estos valores de los parámetros cinéticos sugieren que también F169 participa en forma importante en la unión de GdBAL, incluso más importante que W176, como lo sugirió el acoplamiento manual. Por tanto, al igual que lo que ya hemos propuesto para otros aldehídos, pensamos que es posible que GdBAL se una al menos de dos formas, ambas productivas,

aunque la posición del carbonilo difiera ligeramente entre ellas, lo que se refleja en diferencias en la k_{cat} .

De acuerdo con nuestros resultados, los residuos más importantes para la unión eficiente de GdBAL son D459 y F169, al igual que se observó en el caso de ABAL, pero que los residuos aromáticos W176 y F467 y en menor medida T303 también contribuyen a esta unión.

VIII.5.7. Saturación por TMABAL de las variantes de PaPauC

Los resultados del acoplamiento molecular con este aldehído indicaron que el grupo trimetilamino positivamente cargado posiblemente se ubique entre los anillos aromáticos de F169 y W176 haciendo interacciones catión- π con W176 (Fig. 17J) de manera similar a como se coloca el grupo guanidino del GdBAL, o solo con F169 (Fig. 17K), lejos de D459, T303 y F467A, e incluso más lejos de K479.

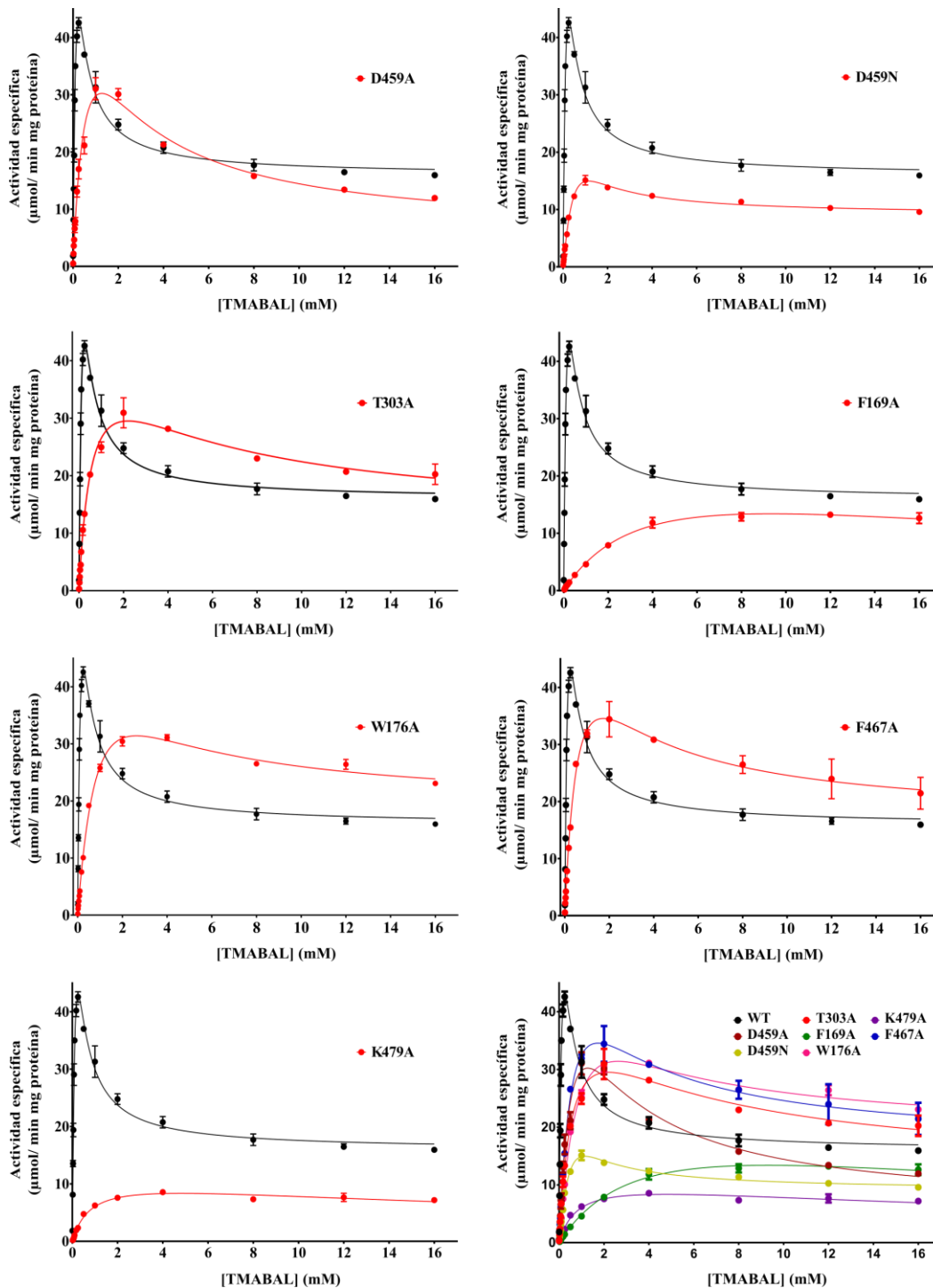


Fig. 27. Curvas de saturación con TMABAL de las diferentes variantes de *PaPauC*. En las gráficas, los puntos son el promedio de los valores de velocidad inicial obtenidos en al menos dos experimentos independientes; las líneas dibujadas son las calculadas a partir del mejor ajuste global de estos datos a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o la ecuación que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), como resultó apropiado. Las líneas verticales indican la desviación estándar del valor promedio de los datos experimentales. Los

puntos negros y sus respectivas curvas corresponden a los datos obtenidos con la enzima silvestre y mostrados antes en la Fig. 14. Con fines comparativos, en el último panel se muestran todas las curvas de saturación de las enzimas variantes y de la silvestre.

Tabla 12. Parámetros cinéticos de las enzimas *PaPauC* silvestre y variantes usando TMABAL como sustrato. Las velocidades iniciales se midieron a 30 °C, pH 8.0 y 0.6 mM de NAD⁺. Los parámetros cinéticos se estimaron por el ajuste de regresión no lineal de los datos experimentales a la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o a la ecuación de inhibición parcial por sustrato (Ec. 2), según fuera apropiado. V_{max} está dada en U/mg proteína, k_{cat} en s⁻¹, K_m y K_{IS} en mM y k_{cat}/K_m , en M⁻¹s⁻¹ × 10⁴. ND, no determinado. NA, no aplica.

Enzima	WT	D459A	D459N	T303A	F169A	W176A	F467A	K479A
Parámetros cinéticos								
V_{max}	144 ± 37	65 ± 13	44 ± 9	47 ± 4	25 ± 3	59 ± 5	63 ± 5	13 ± 2
k_{cat}	128 ± 33	58 ± 12	39 ± 8	42 ± 4	22 ± 3	52 ± 4	56 ± 4	12 ± 2
K_m	0.3 ± 0.1	0.7 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.6 ± 0.1	4.2 ± 0.6	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	1 ± 0.3
k_{cat}/K_m	43.0 ± 18.1	8.3 ± 2.9	3.5 ± 1.2	7.0 ± 1.3	0.5 ± 0.1	4.3 ± 0.8	8.0 ± 1.3	1.2 ± 0.4
$V_{max\ inh}$	16 ± 1	5 ± 2	9 ± 0.3	12 ± 3	NA	19 ± 2	17 ± 1	6 ± 1
K_{IS}	0.14 ± 0.05	2 ± 1	0.5 ± 0.2	5 ± 2	NA	2 ± 1	2.2 ± 0.6	2 ± 2

Sin embargo, la caracterización cinética de las mutantes mostró que los valores de k_{cat}/K_m disminuyeron en una proporción significativa (alrededor de cinco veces) y similar en las variantes D459A, T303A y F467A. El cambio en k_{cat}/K_m fue mayor en la variante W176A (aprox. 10 veces). Estos resultados sugieren que el TMABAL podría adoptar otras dos formas de unión compatibles con la catálisis: una en la que interaccionara con T303 y D459 y otra interaccionando con F467 y con W176. La disminución en k_{cat} fue entre dos y tres veces en todas estas mutantes, sugiriendo que ambas formas de unión producen un complejo catalíticamente cercano al correcto. De hecho, la k_{cat} y la k_{cat}/K_m de la enzima silvestre con este aldehído son las mayores de las observadas con los aldehídos probados (prácticamente iguales a las de GluAPAL). Al igual que con los otros sustratos, los cambios en los parámetros cinéticos de las variantes D459N y F169A y K479A fueron mayores que los de las otras variantes, pero pensamos que ello se debe a los importantes efectos que estas variantes tienen sobre todos los aldehídos por las razones ya discutidas. Aunque resulta interesante que el cambio de k_{cat}/K_m en la mutante K479A es menor que el observado con PAL, lo que de nuevo puede ser explicado porque la interacción del TMABAL con los residuos aromáticos del sitio activo, pero sobre todo con D459 contrarreste en parte la desorganización del sitio activo que pensamos provoca la sustitución de la cadena lateral de K479 por una alanina manteniendo a D459 en la posición que tiene en la enzima silvestre.

IX. DISCUSIÓN

Capítulo II

Residuos de aminoácidos importantes para la especificidad por el aldehído de PaPauC

La caracterización cinética, la determinación de la estructura tridimensional, las simulaciones de acoplamiento molecular y la mutagénesis sitio-dirigida son herramientas valiosas en los estudios enzimológicos que se complementan para ayudar a comprender las características del sitio activo que permiten el reconocimiento del sustrato y la catálisis. En este trabajo de tesis usamos todas ellas para investigar la especificidad de la enzima *PaPauC* por sus sustratos aldehídos con los resultados ya descritos y discutidos y que a continuación discutimos de forma general.

IX.1. La caracterización cinética de la enzima mostró la eficiencia catalítica de *PaPauC* con cada uno de los sustratos fisiológicos

Nuestros resultados cinéticos indican que *PaPauC* puede oxidar aldehídos alifáticos, ya sea con diferentes sustituyentes como grupos amino, glutamil, trimetilamino y guanidino, o sin sustituyente, como PAL, lo que la hace una enzima de especificidad amplia. A pesar de esto, su sitio activo parece haber sido optimizado para oxidar con mayor eficiencia catalítica al GluAPAL, intermediario de la degradación de Spm, Spd y Dap, permitiéndole discriminar incluso entre aldehídos con estructuras muy parecidas como el GluABAL, que solamente tiene un carbono más en su cadena alifática y cuya constante de especificidad es 11 veces menor que la del GluAPAL. Los valores de la constante de especificidad k_{cat}/K_m para TMABAL y GluAPAL son los más altos, sugiriendo que las interacciones que ocurren entre la *PaPauC* y estos dos sustratos son más favorables respecto a los demás aldehídos. Es decir, estas interacciones facilitan una unión catalíticamente más eficiente en la que el aldehído quede orientado en el sitio activo a la distancia y orientación correctas de los residuos catalíticos, o de la coenzima NAD^+ una vez que se forma el tiohemiacetal, para que se lleven a cabo los pasos catalíticos, lo que se refleja en un aumento de k_{cat} y de k_{cat}/K_m . Por el contrario, a veces las interacciones que los aldehídos hacen con el sitio activo pueden ser contraproducentes para facilitar una unión óptima para la catálisis, como parece ser el caso del GluABAL, y eso se refleja en una disminución de k_{cat} y k_{cat}/K_m . En este mismo sentido,

el grupo amino del APAL, que es el peor sustrato de la enzima, parece tener un efecto contraproducente para su unión catalíticamente eficiente. Ello ocasiona el importante efecto fisiológico que se discutió en el Capítulo I, en el que se describe como el APAL—formado en las células de *P. aeruginosa* como intermediario de las rutas de degradación de Spm, Spd y Dap— es poco oxidado por *PaPauC*, por lo que las concentraciones intracelulares de APAL se acumulan y producen toxicidad. Finalmente, el sustrato, o una región de éste, así como el sitio activo deben poseer cierto grado de flexibilidad para acomodar los cambios que acompañen al ciclo catalítico. Por ejemplo, en el caso de las ALDHs se sabe que en el mecanismo catalítico se pasa de un carbono planar a uno tetraédrico y de regreso a uno planar en dos ocasiones (Muñoz-Clares *et al.*, 2010).

IX.2. La estructura tridimensional de *PaPauC* explica la especificidad por sus sustratos encontrada en los estudios cinéticos

Para entender mejor las características estructurales que pueden ser responsables de la especificidad de la *PaPauC*, hicimos una comparación estructural de los sitios activos de *PaPauC* con los de otras enzimas AMADHs de estructuras ya conocidas, como la BADHs de *P. aeruginosa* (*PaBADH*; código PDB: 2WME, González-Segura *et al.*, 2009), espinaca (*SoBADH*; código PDB:4A0M, Díaz-Sánchez *et al.*, 2012) y la enzima de humano ALDH9A1 (código PDB: 6VR6, Wyatt *et al.*, 2020), así como con el de la ALDH2 de humano (código PDB: 1CW3, Ni *et al.*, 1999), la que, aunque no es una AMADH, en su sitio activo posee un aspartato en la posición equivalente a D459 y residuos aromáticos equivalentes a los que hemos estudiado en *PaPauC*. Estas comparaciones se muestran en la Fig. 28.

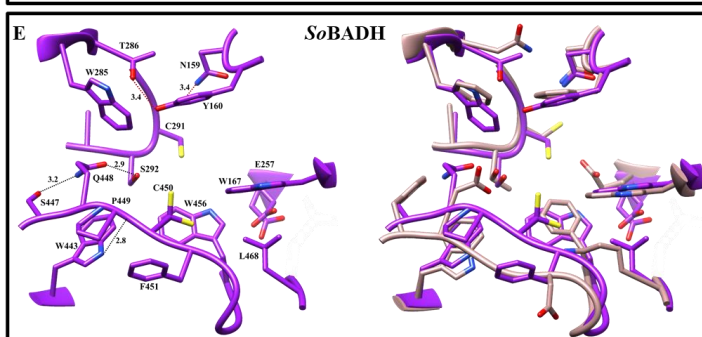
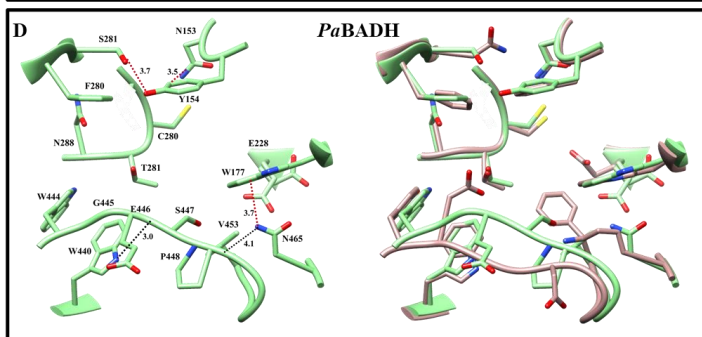
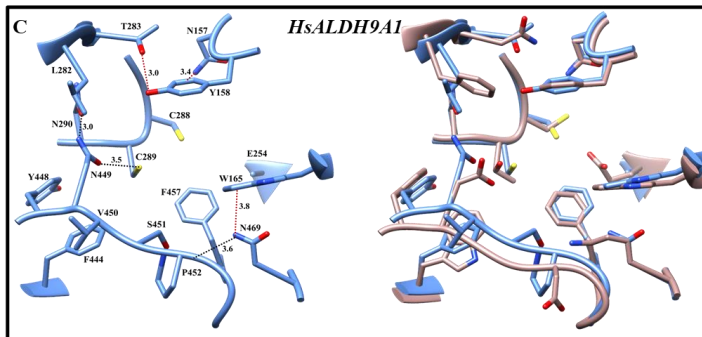
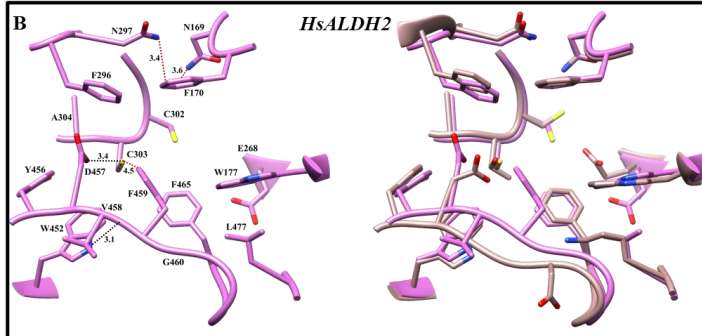
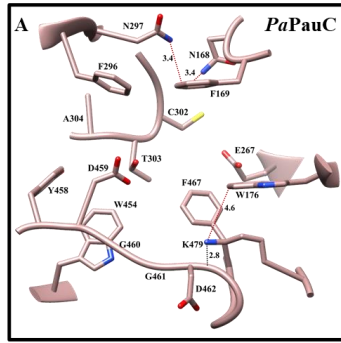


Fig. 28. Comparación de los sitios activos de la enzima *PaPauC* con enzimas con actividad AMADH y las ALDHs de humano. Las cadenas laterales de los aminoácidos están dibujadas como varillas coloreadas por átomo (oxígenos en rojo, nitrógenos en azul, azufres en amarillo) y las cadenas principales como lazos con los átomos de carbono coloreados de acuerdo a la proteína mostrada: café claro para *PaPauC* (código PDB 6B4R), magenta para *HsALDH2* (código PDB 1CW3), azul para *ALDH9A1* (código PDB 6VR6), verde para *PaBADH* (código PDB 2WME) y morado para *SoBADH* (código PDB 4A0M). Las figuras de la izquierda corresponden a la estructura de cada enzima con sus respectivos residuos etiquetados y las figuras de la derecha corresponden a la sobreposición de la estructura de cada enzima con la estructura de *PaPauC*.

En todas las estructuras cristalográficas analizadas se conserva la interacción π -stacking que hace el grupo amida de la cadena lateral de la asparagina catalítica con el residuo aromático equivalente a F169 en *PaPauC*, aunque en la *PaBADH*, *SoBADH* y *ALDH9A1* la fenilalanina cambia por una tirosina. De igual forma, se conserva la interacción π -stacking que hace el residuo equivalente a N297 de *PaPauC* con el equivalente a F169 en todas las enzimas, a excepción de la *ALDH9A1* de humano y la *SoBADH*, que tienen un residuo de treonina, y la *PaBADH* que tiene un residuo de serina. Pero todos estos residuos hacen un puente de H con el hidroxilo de la cadena lateral de la tirosina en la posición equivalente a F169. En cualquier caso, estas interacciones permiten mantener al residuo aromático equivalente a F169 en la posición adecuada, ya sea para estabilizar el correcto posicionamiento de la asparagina catalítica, N168, en el sitio activo para formar el “hoyo del oxianión”, o para contribuir a la polarización del carbono carbonílico mediante una interacción anión- π con el oxígeno del grupo aldehído, haciéndolo mejor electrófilo y facilitando así la reacción en la que se forma el tiohemiacetal. Por ello, como ya se mencionó, proponemos que F169 es un residuo importante en la catálisis de cualquier aldehído. Pero, además, nuestros resultados indicaron que F169 participa en forma importante en la unión de ciertos aldehídos en *PaPauC*, contribuyendo a la especificidad. En cuanto a los otros residuos aromáticos, los equivalentes a W176 y F467, todos conservan su carácter aromático y mantienen casi la misma posición en todas las estructuras, a excepción de la enzima *PaBADH* que tiene una V453 en lugar de la F467 de *PaPauC*. La conservación de estos residuos, particularmente F169 y W176, sugiere que son importantes para la estructuración del sitio activo de las ALDHs.

Por otra parte, D459 en *PaPauC* está expuesto en la superficie del sitio de unión del aldehído, lo que le permite interactuar con los grupos amino de algunos de sus sustratos, pero esta interacción puede ser un impedimento para una unión productiva de ciertos aminoaldehídos que al interactuar con la carga negativa del carboxilo de D459 pueden adoptar una posición

incompatible con la catálisis. O bien, la posición de la cadena lateral de D459 puede generar un impedimento estérico para una unión productiva del aldehído. Este podría ser el caso de la betaína aldehído, un aminoaldehído que posee un voluminoso grupo trimetilamonio y que es buen sustrato de las otras AMADHs aquí mostradas pero que no es oxidado por *PaPauC* (resultados no mostrados). En las otras AMADHs en lugar de D459 existen residuos no cargados y no expuestos a la superficie del sitio de unión. En la ALDH2 de humano, el D457, equivalente a D459 de *PaPauC*, está dirigido hacia atrás del sitio activo, haciendo un puente de H con el grupo tiol de C303, que es el residuo equivalente a T303 en *PaPauC*. Así, en la AMADH de humano, la ALDH9A1, la N449, equivalente a D459 de *PaPauC*, no tiene carga y está dirigida hacia atrás del sitio activo, haciendo un puente de H con el grupo tiol de C303, que es el residuo equivalente a T303 en *PaPauC*. Igualmente, en la *SoBADH*, la glutamina equivalente a D459 está atrás del sitio activo haciendo un puente de hidrógeno con la serina equivalente a T303. Y en la *PaBADH* el residuo equivalente a D459 es una glicina. Es interesante que en el sitio activo de todas las enzimas que hemos comparado estructuralmente con *PaPauC*, esta asa tiene la misma posición y diferente a la de *PaPauC*. Esta parece ser una característica estructural importante para la especificidad de *PaPauC*, ya que permite colocar el grupo carboxilo de D459 en el sitio activo en la posición en la que puede interaccionar con los grupos amino de los sustratos. Otra característica estructural que parece relevante para permitir la unión de aldehídos relativamente grandes, es que la entrada al túnel del aldehído es más amplia en *PaPauC* que en las otras AMADHs, lo que se debe a que en *PaPauC* existe un residuo de glicina, G641, en la posición equivalente a residuos de serina o cisteína en las otras enzimas. Estas diferencias en la arquitectura del sitio activo y su polaridad entre la *PaPauC* y la ALDH9A1 se podría aprovechar para diseñar un inhibidor específico de *PaPauC* que no afecte la actividad de la AMDH de humano.

IX.3. El acoplamiento molecular es una herramienta guía que se debe complementar con estudios experimentales

Los programas de acoplamiento actuales pueden predecir, en general, los modos de interacción proteína-ligando correctos. Sin embargo, en el caso de las simulaciones del acoplamiento entre el sitio activo de una enzima y su sustrato, a menudo sucede que la pose con la puntuación más alta en el cálculo de energías de enlace no es la que cumple con los

requerimientos para una catálisis efectiva (Waszkowycz *et al.*, 2011). Por ello, el alcance y las capacidades del acoplamiento molecular han sido debatidos a lo largo de los años.

Otro desafío importante es considerar las interacciones π (de cualquier tipo) durante el proceso de acoplamiento que, en el caso de las ALDHs en general y de las AMADHs en particular, son interacciones importantes y que, hasta lo que conocemos, los programas que existen actualmente no tienen en cuenta. Es por esto que, para aplicaciones prácticas, el acoplamiento debe integrarse con otras técnicas experimentales, según los objetivos principales del estudio. Por ejemplo, se debe realizar experimentos bioquímicos para confirmar la unión putativa predicha con el acoplamiento.

Si bien algunos aspectos de la simulación y el cálculo aún deben mejorarse quizás mediante programas que incluyan en sus cálculos los aportes de todas las interacciones de tipo π y van der Waals, los métodos de acoplamiento actuales ayudan a guiar los estudios de especificidad de las enzimas por sus ligandos, pero son los experimentos de mutación sitio-dirigida y caracterización cinética de las variantes obtenidas los que permiten confirmar las predicciones hechas en el acoplamiento molecular y proporcionan información muy valiosa para comprender el comportamiento de la enzima con los diferentes sustratos.

En algunos casos, recurrimos a hacer acoplamientos moleculares manuales porque o bien el método bioinformático utilizado no arrojó ninguna pose de un complejo pre-catalítico, caso de APAL, o bien los datos de la caracterización cinética de las enzimas variantes indicaban interacciones aldehído-enzima adicionales a las que mostraban las poses encontradas por el método bioinformático. Al realizar estos acoplamientos en forma manual, aplicamos los mismos criterios para una unión que pudiera dar lugar a catálisis con los que seleccionamos las poses del método bioinformática, y siempre tuvimos en cuenta que no surgieran choques estéricos entre el aldehído y la proteína.

IX.4. La mutagénesis sitio-dirigida confirmó los residuos importantes para la especificidad de *PaPauC* por cada aldehído.

A pesar de las limitaciones comentadas en el apartado anterior, los estudios de acoplamiento molecular claramente señalaron cuáles residuos participaban en la unión de los aldehídos en el sitio activo de *PaPauC*: T303, D459, F169, W176, F467 y K479. La caracterización cinética de las variantes en las que se cambiaron individualmente estos residuos

por alanina, y por asparagina en el caso de D459, indicaron cuales de ellos son importantes para la unión específica y catalíticamente competente de cada uno de los sustratos y cuáles lo son para la unión de todos ellos. Nos mostraron claramente los efectos funcionales de los cambios hechos en las variantes permitiéndonos distinguir los efectos sobre la catálisis de los efectos específicos sobre la unión de un aldehído en particular. Además, nos dieron indicios de posibles papeles estructurales de algunos de los residuos del sitio activo que contribuyen a su arquitectura nativa.

La Fig. 29 muestra en forma resumida el efecto de cada una de las variantes sobre los parámetros cinéticos obtenidos con diferentes aldehídos respecto a los obtenidos con la enzima *PaPauC* silvestre.

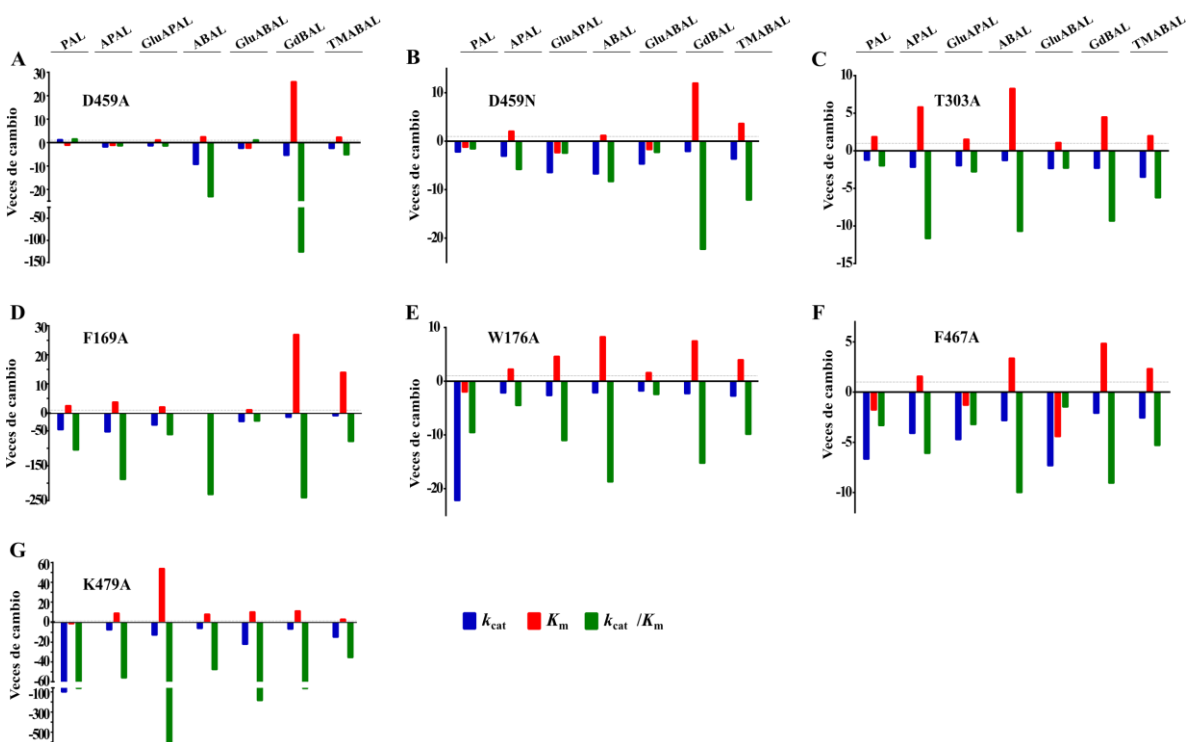


Fig. 29. Comparación de los parámetros cinéticos de las enzimas variantes respecto a los de *PaPauC* con diferentes aldehídos. Las barras indican las veces de cambio de los parámetros cinéticos estimados de las variantes respecto a los de *PaPauC* silvestre usando el conjunto completo de datos experimentales y su ajuste mediante la ecuación de Michaelis-Menten (Ec. 1) o mediante la ecuación de Michaelis-Menten que contempla inhibición parcial por sustrato (Ec. 2) según correspondía.

Se puede observar que la variante K479A fue la que más afectó los parámetros cinéticos de todos los aldehídos ensayados y que GluAPAL fue el aldehído más afectado con esta variante, seguido del GluABAL. F169A fue la siguiente variante en afectar más los parámetros cinéticos de los aldehídos, siendo el GdBAL y el ABAL los aldehídos más afectados. La variante D459A también tuvo efectos importantes sobre todo con GdBAL y ABAL. En cuanto a las demás variantes, todas tuvieron un efecto de más o menos de la misma magnitud sobre los aldehídos. En orden de mayor a menor efecto sobre los parámetros cinéticos tenemos: D459N cuyo efecto es mayor sobre el GdBAL, W176A que afectó el ABAL, GdBAL y GluAPAL, la T303A que afectó el APAL, ABAL y GdBAL y finalmente F467A que afectó el ABAL y GdBAL. En conjunto nuestros resultados apoyan que son varios los residuos del sitio activo de la enzima *PaPauC* que permiten la catálisis de aldehídos estructuralmente muy diferentes, como lo son sus sustratos fisiológicos, aunque con eficiencias catalíticas distintas.

Los residuos aromáticos del sitio activo F169, F467 y W176 contribuyen a la unión por medio de interacciones catión- π de aldehídos con grupos amino, trimetilamino o guanidino con una distancia y orientación apropiada y parecen tener una función estructural importante en el sitio activo. Algunos de ellos parecen estar determinando en parte la disposición de otro residuo, por lo que el efecto observado en su sustitución por una alanina puede provocar alteraciones en la conformación de ese otro residuo y los efectos observados a consecuencia de esta sustitución no solo pueden deberse a que se elimine una interacción con el sustrato. Incluso, como se reportó para las estructuras tridimensionales de la enzima ALDH7A1 y dos variantes de ésta, el cambio de W175, equivalente a W176 en *PaPauC*, por una glicina, o el cambio de N167, equivalente a N168 en *PaPauC*, por una serina que disminuyen el volumen estérico de la cadena lateral, hacen que la enzima tienda a relajarse en el espacio adicional creado por la mutación, y dicha perturbación estructural probablemente da como resultado una desalineación del sustrato aldehído, lo que lleva a una disminución importante de la actividad catalítica (Laciak *et al.*, 2019). Esto también ocurre cuando se cambia el residuo K479 por alanina.

Nuestros resultados indican que la carga negativa de D459 es importante para la unión del grupo amino y guanidino del ABAL y el GdBAL pero no es tan importante para la unión de los grupos amino, trimetilamino y amido de los demás aldehídos. Poner un residuo sin carga como la asparagina en esta posición disminuye la especificidad por todos los sustratos indicando que la interacción con el D459 es netamente iónica. El residuo T303 es importante para la unión del APAL y en menor medida para el GluAPAL, ABAL, GluABAL y GdBAL, es decir, la interacción

de puente de H es importante para aldehídos de cadena alifática corta o aldehídos cuya estructura posea un grupo neutro, como el grupo amida del GluAPAL y el GluABAL, en una posición cercana a la T303. Finalmente, el residuo K479 es importante para la unión de aldehídos con cadenas alifáticas largas y con grupos cargados negativamente como el GluAPAL y el GluABAL, aunque como se mencionó, también afecta la unión correcta de los demás aldehídos debido a cambios estructurales en el sitio activo y no por pérdida de interacciones con ellos.

IX.5. Las características estructurales del sitio activo de *PaPauC* podrían usarse para desarrollar un inhibidor específico de esta enzima

Las ALDH implicadas en el catabolismo de las poliaminas en animales pertenecen a la familia ALDH9 (Vasiliou y Nebert, 2005). Una comparación estructural de la enzima humana con *PaPauC* muestra diferencias estructurales en los residuos del sitio de unión al aldehído de estas enzimas (Fig. 30) que sugieren que podría ser factible inhibir específicamente *PaPauC* sin afectar la ALDH9A1. Mientras que los residuos catalíticos (la cisteína catalítica, el glutámico catalítico y la asparagina catalítica) y dos residuos aromáticos (W176 y F467 en *PaPauC* equivalentes a W165 y F457 en ALDH9A1) se conservan, otros residuos del subsitio de unión del aldehído como F169, T303, D459 y K479 en *PaPauC* se cambian a Y158, C289, N449 y N469, respectivamente, en ALDH9A1. La carga negativa de la cadena lateral de D459 en *PaPauC* podría usarse para aumentar la unión de un aldehído con una carga positiva en su sitio activo, como lo muestran nuestros resultados. La carga y los cambios en el tamaño y en la posición de los otros residuos, junto con un movimiento lejos del sitio activo en *PaPauC* del asa a la que pertenecen D459, dan como resultado un acceso al subsitio de unión al aldehído en *PaPauC* más ancho que en ALDH9A1, lo que podría aprovecharse para utilizar una molécula voluminosa como inhibidor de *PaPauC* y no de ALDH9A1. La representación de la superficie del túnel de entrada de aldehído en *PaPauC* y ALDH9A1 en las Figs. 30A y B, respectivamente, muestra los diferentes tamaños de este túnel.

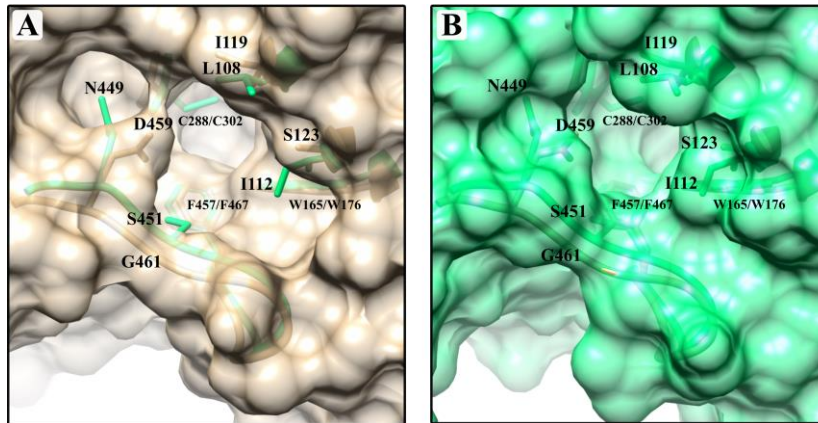


Fig. 30. Comparación estructural de los sitios activos de *PaPauC* y *ALDH9A1*. A y B) Representación como superficie del sitio de unión del aldehído en *PaPauC* (PDB: 6B4R; carbonos de color marrón claro) y *ALDH9A1* (PDB: 6VR6, carbonos verdes). La figura se hizo con UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>).

X. CONCLUSIONES

- Nuestros resultados contribuyen a la comprensión del catabolismo de Spm, Spd y Dap en la bacteria *P. aeruginosa*, arrojan luz sobre la participación de APAL en el mecanismo de toxicidad de estas tres poliaminas importantes y proporcionan evidencia del importante papel de *PaPauC* en disminuir esta toxicidad. Por lo tanto, *PaPauC* emerge como un nuevo potencial objetivo farmacológico para combatir la infección por este importante patógeno. La eficiencia catalítica mucho menor de *PaPauC* para APAL que para GluAPAL probablemente conduciría a la acumulación de APAL hasta niveles tóxicos en condiciones fisiológicas, incluso si no se logra su inhibición completa, especialmente si su inhibición se acompaña con una dieta suplementada con Spd, que actualmente se considera un importante suplemento nutricional humano. Además, la inhibición de *PaPauC* junto con la administración dietética de Spd puede ser una terapia adyuvante para aumentar la eficacia de los tratamientos antibióticos.
- Nuestros resultados contribuyen al conocimiento detallado de la estructura del sitio activo de la enzima *PaPauC*, revelando los residuos importantes para la unión catalíticamente competente de los aldehídos que son sus sustratos fisiológicos y permitiendo distinguir el papel que estos residuos juegan en la catálisis del papel que juegan sobre la unión de los aldehídos. El conocimiento de las bases estructurales de la especificidad de esta enzima permitirá el diseño y/o selección de inhibidores específicos de la enzima.

XI. PERSPECTIVAS

- Identificar, diseñar y/o seleccionar compuestos que inhiban específicamente a la enzima *PaPauC* y evaluar su inhibición in vitro.
- Investigar el efecto inhibitorio de los compuestos seleccionados sobre el crecimiento in vitro de *P. aeruginosa*, determinando la IC50 de aquellos compuestos que produzcan inhibición del crecimiento.
- Determinar si el efecto de inhibición del crecimiento de la bacteria, en los casos en los que ocurra, es causado por la acumulación dentro de ella de los aldehídos sustratos de esta enzima.
- Determinar la estructura cristalina de la enzima *PaPauC* con los compuestos inhibidores unidos para entender la razón estructural de su eficiencia y/o especificidad.
- Evaluar si enzimas ALDHs de humano son inhibidas por aquellos compuestos que inhiban a la enzima *PaPauC*.

XII. BIBLIOGRAFÍA

Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B & Lindahl E (2015) {GROMACS}: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1-2,19 - 25.

Agostinelli E (2020) Biochemical and pathophysiological properties of polyamines. *Amino Acids* 52, 111–117.

Alarcon RA (1964) Isolation of acrolein from incubated mixtures of spermine with calf serum and its effect on mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 106, 240–242

Alarcon RA (1970) Evidence for the formation of the cytotoxic aldehyde acrolein from enzymatically oxidized spermine or spermidine. *Arch Biochem Biophys* 137, 365-372.

Aqvist J, Medina C & Samuelsson JE (1994) A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. *Protein Eng* 7, 385-91.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1997) *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology*, 3rd edn. Wiley, NY.

Bachrach U (2012) Polyamines and carcinogenesis. *Acta Fac Medicae Naissensis* 29, 165-174.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.

Cardona-Cardona, Y. V. (2017). Clonación, sobreexpresión y caracterización cinética y estructural de la enzima aminoaldehído deshidrogenasa PA5312 (*PaKauB*) de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.

Case DA, Cheatham TE 3rd, Darden T, Gohlke H, Luo R, Merz KM Jr, Onufriev A, Simmerling C, Wang B & Woods RJ (2005) The Amber biomolecular simulation programs. *J Comput Chem* 26, 1668-88.

Chen C, Joo JC, Brown G, Stolnikova E, Halavaty AS, Savchenko A, Anderson WF & Yakunin AF (2014) Structure-based mutational studies of substrate inhibition of betaine aldehyde dehydrogenase BetB from *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 80, 3992–4002.

Chen Y, Zhu J-Y, Hong KH, Mikles DC, Georg GI, Goldstein AS, Amory JK & Schönbrunn E (2018) Structural basis of ALDH1A2 inhibition by irreversible and reversible small molecule inhibitors. *ACS Chem Biol* 13, 582–590.

Chou HT, Kwon DH, Hegazy M & Lu CD (2008) Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 190, 1966–1975.

Chou HT, Li JY & Lu CD (2014) Functional Characterization of the agtABCD and agtSR operons for 4-aminobutyrate and 5-aminovalerate uptake and regulation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr Microbiol* 68, 59–63.

Chou HT, Li JY, Peng YC & Lu CD (2013) Molecular characterization of PauR and its role in control of putrescine and cadaverine catabolism through the γ -glutamylolation pathway in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 195, 3906–3913.

Cohen LF, Lundgren DW & Farrell PM (1976) Distribution of spermidine and spermine in blood from cystic fibrosis patients and control subjects. *Blood* 48, 469-475.

Costa DL, Kutzman RS, Lehmann JR & Drew RT (1986) Altered lung function and structure in the rat after subchronic exposure to acrolein. *Am Rev Respir Dis* 133, 286-291.

Cross JB, Thompson DC, Rai BK, Baber JC, Fan KY, Hu Y & Humblet C (2009) Comparison of several molecular docking programs: pose prediction and virtual screening accuracy. *J Chem Inf Model* 49, 1455–1474.

Dasu VV, Nakada Y, Ohnishi-Kameyama M, Kimura K & Itoh Y (2006) Characterization and a role of *Pseudomonas aeruginosa* spermidine dehydrogenase in polyamine catabolism. *Microbiology* 152, 2265–2272.

Dawson RM, Elliot DC, Elliot WH & Jones KM (1986) Data for biochemical research, 3rd edn. Clarendon Press, Oxford.

De Azevedo Wäsch SI, Van der Ploeg JR, Maire T, Lebreton A, Kiener A, Leisinger T (2002) Transformation of isopropylamine to L-alaninol by *Pseudomonas sp. strain KIE171* involves N-glutamylated intermediates. *Appl Environ Microbiol* 68, 2368–2375.

Del Rio B, Redruello B, Linares DM, Ladero V, Ruas-Madiedo P, Fernandez M, Martin MC & Alvarez MA (2019) The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci Rep* 9, 120

Díaz-Sánchez ÁG, González-Segura L, Mújica-Jiménez C, Rudiño-Piñera E, Montiel C, Martínez-Castilla LP & Muñoz-Clares RA (2012) Amino acid residues critical for the specificity for betaine aldehyde of the plant ALDH10 isoenzyme involved in the synthesis of glycine betaine. *Plant Physiol* 158, 1570–1582.

Driscoll JA, Brody SL & Kollef MH (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 67, 351–368.

Forouhar F, Lee IS, Vujcic J, Vujcic S, Shen J, Vorobiev SM, Xiao R, Acton TB, Montelione GT, Porter CW & Tong L (2005) Structural and functional evidence for *Bacillus subtilis* PaiA as a novel N¹-spermidine/spermine acetyltransferase. *J Biol Chem* 280, 40328–40336.

Foster A, Barnes N, Speight R & Keane MA (2013) Genomic organisation, activity and distribution analysis of the microbial putrescine oxidase degradation pathway. *Syst Appl Microbiol* 36, 457–466.

Forte-McRobbie CM & Pietruszko R (1986) Purification and characterization of human liver “high Km” aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic gamma-semialdehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* 261, 2154–2163.

Fothergill JC & Guest JR (1977) Catabolism of L-lysine by *Pseudomonas aeruginosa* *J Gen Microbiol* 99, 139–155.

Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, Scalmani G, Barone V, Petersson GA, Nakatsuji H, Li X, Caricato M, Marenich AV, Bloino J, Janesko BG, Gomperts R, Mennucci B, Hratchian HP, Ortiz JV, Izmaylov AF, Sonnenberg JL, Williams-Young D, Ding F, Lipparini F, Egidi F, Goings J, Peng B, Petrone A, Henderson T, Ranasinghe D, Zakrzewski VG, Gao J, Rega N, Zheng G, Liang W, Hada M, Ehara M, Toyota K, Fukuda R, Hasegawa J, Ishida M, Nakajima T, Honda Y, Kitao O, Nakai H, Vreven T, Throssell K, Montgomery JA Jr, Peralta JE, Ogliaro F, Bearpark MJ, Heyd JJ, Brothers EN, Kudin KN, Staroverov VN, Keith TA, Kobayashi R, Normand J, Raghavachari K, Rendell AP, Burant JC, Iyengar SS, Tomasi J, Cossi M, Millam JM, Klene M, Adamo C, Cammi R, Ochterski JW, Martin RL, Morokuma K, Farkas O, Foresman JB & Fox DJ (2016) Gaussian 16, Revision C.01. <https://gaussian.com/>

Galli G & Saleh M (2021) Immunometabolism of macrophages in bacterial infections. *Front Cell Infect Microbiol* 10, 607650.

Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD & Bairoch A (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* 31, 3784–3788.

Ghilarducci DP & Tjeerdema RS (1995) Fate and effects of acrolein. *Rev Environ Contam Toxicol* 144, 95–146.

Gill SC & Von Hippel PH (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319–326.

Gonzalez ME, Marco F, Minguet EG, Carrasco-Sorli P, Blázquez MA, Carbonell J, Ruiz OA & Pieckenstain FL (2011) Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiol* 156, 2266–2277.

González-Segura L, Rudiño-Piñera E, Muñoz-Clares RA & Horjales E (2009) The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP+ and a novel cation binding site. *J Mol Biol* 385, 542–557.

González-Segura L, Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A & Muñoz-Clares RA (2015) Residues that influence coenzyme preference in the aldehyde dehydrogenases. *Chem-Biol Interact* 234, 59–74.

Grasemann H, Shehnaz D, Enomoto M, Leadley M, Belik J & Ratjen F (2012) L-ornithine derived polyamines in cystic fibrosis airways. *PLoS ONE* 7, e46618.

Haas D, Evans R, Mercenier A, Simon JP & Stalon V (1979) Genetic and physiological characterization of *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in the catabolic ornithine carbamoyltransferase. *J Bacteriol* 139, 713–720.

Haas D, Matsumoto H, Moretti P, Stalon V & Mercenier A (1984) Arginine degradation in *Pseudomonas aeruginosa* mutants blocked in two arginine catabolic pathways. *Mol Gen Genet* 193, 437–444.

Hart GJ & Dickinson FM (1982) Kinetic properties of highly purified preparations of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* 203, 617–627.

Hassan M, Morimoto S, Murakam H, Ichiyanagi T & Mori N (2007) Purification and characterization of 4-N-Trimethylamino-1-butanol dehydrogenase of *Pseudomonas sp.* 13CM. *Biosci Biotechnol Biochem* 71, 1439–1446.

Hassan M, Okada M, Ichiyanagi T, Mori N (2008) 4-N-trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase: purification and characterization of an enzyme from *Pseudomonas sp.* 13CM. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 155–162.

Henehan GTM & Tipton KF (1992) Steady-state kinetic analysis of aldehyde dehydrogenase from human erythrocytes. *Biochem J* 287, 145–150. Humphrey W, Dalke A & Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33–38.

Ibarra AA, Wrobel K, Escobosa AR, Elguera JC, Garay-Sevilla ME & Wrobel K (2015) Determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine in different chemical matrices by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-ITMS/MS). *J Chromatogr B* 1002, 176–184.

Inagaki E, Ohshima N, Takahashi H, Kuroishi C, Yokoyama S & Tahirov T (2006) Crystal structure of *Thermus thermophilus* Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *J Mol Biol* 362, 490–501.

Indurthi SM, Chou HT & Lu CH (2016) Molecular characterization of lysR-lysXE, gcdR-gcdHG and amaR-amaAB operons for lysine export and catabolism: a comprehensive lysine catabolic network in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology* 162, 876–888.

Ivanova S, Batliwalla F, Mocco J, Kiss S, Huang J, Mack W, Coon A, Eaton JW, Al-Abed Y, Gregersen PK, Shohami E, Connolly Jr ES & Tracey KJ (2002) Neuroprotection in cerebral ischemia by neutralization of 3-aminopropanal. *PNAS* 99, 5579–5584.

Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R, Chun-Rong L, Guenther D, Bovee D, Olson MV & Manoil C (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 100, 14339–14344.

Jann A, Matsumoto H & Haas D (1988) The fourth arginine catabolic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 134, 1043–1053.

Jang EH, Park SA, Chi YM & Lee KS (2015) Structural insight into the substrate inhibition mechanism of NADP⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes*. *Biochem Biophys Res Commun* 46, 487–493.

Jastrzab R, Kaczmarek MT, Nowak M, Trojanowska A & Zabizak M (2017) Complexes of polyamines and their derivatives as living system active compounds. *Coord Chem Rev* 351, 32–44.

Jeong H, Mason SP, Barabasi AL & Oltvai ZN (2001) Lethality and centrality in protein networks. *Nature* 411, 41–42.

Johnson DA, Tetu SG, Phillippy K, Chen J, Ren Q & Paulsen IT (2008) High-Throughput phenotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* membrane transport genes. *PLoS Genet* 4, e1000211.

Kakegawa T, Guo Y, Chiba Y, Miyazaki T, Nakamura M, Hirose S, Canellakis ZN & Igarashi K (1991) Effect of acetylpolyamines on *in vitro* protein synthesis and on the growth of a polyamine-requiring mutant of *Escherichia coli*. *J Biochem* 109, 627–631.

Kiechl S, Pechlaner R, Willeit P, Notdurfter M, Paulweber B, Willeit K, Werner P, Ruckenstein C, Iglseder B, Weger S, Mairhofer B, Gartner M, Kedenko L, Chmelikova M, Stekovic S, Stuppner H, Oberhollenzer F, Kroemer G, Mayr M, Eisenberg T, Tilg H, Madeo F & Willeit J (2018) Higher spermidine intake is linked to lower mortality: a prospective population-based study. *Am J Clin Nutr* 108, 371–380.

Kilbourn JP (1978) Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* 311, 334.

Kimes BW & Morris DR (1971) Inhibition of nucleic acid and protein synthesis in *Escherichia coli* by oxidized polyamines and acrolein. *Biochim Biophys Acta* 228, 235–244.

Kopečný D, Tylichová M, Snegaroff J, Popelková H & Šebela M (2011) Carboxylate and aromatic active-site residues are determinants of high-affinity binding of ω -aminoaldehydes to plant aminoaldehyde dehydrogenases. *FEBS J* 278, 3130–3139.

Krysenko S, Matthews A, Busche T, Bera A & Wohlleben W (2021) Poly- and monoamine metabolism in *Streptomyces coelicolor*: the new role of glutamine synthetase-like enzymes in the survival under environmental stress. *Microb Physiol* 27, 1–15.

Krysenko S, Okoniewski N, Kulik A, Matthews A, Grimpo J, Wohlleben W & Bera A (2017) Gamma-glutamylpolyamine synthetase GlnA3 is involved in the first step of polyamine degradation pathway in *Streptomyces coelicolor* M145. *Front Microbiol* 8, 726.

Kurihara S, Oda S, Kato K, Kim HG, Koyanagi T, Kumagai H & Suzuki H (2005) A novel putrescine utilization pathway involves γ -glutamylated intermediates of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* 280, 4602–4608.

Kwon DH & Lu CD (2006) Polyamines increase antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1623–1627.

Laciak AR, Korasick DA, Wyatt JW, Gates KS & Tanner JJ (2019) Structural and biochemical consequences of pyridoxine-dependent epilepsy mutations that target the aldehyde binding site of aldehyde dehydrogenase ALDH7A1. *FEBS J* 287, 173–189.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Large PJ (1992) Enzymes and pathways of polyamine breakdown in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 88, 249–262.

Li B, Maezato Y, Kim SH, Kurihara S, Liang J & Michael AJ (2019) Polyamine-independent growth and biofilm formation, and functional spermidine/spermine N-acetyltransferases in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* 111, 159–175.

Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO & Shaw DE (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78, 1950–8.

Liu ZJ, Sun YJ, Rose J, Chung YJ, Hsiao CD, Chang WR, Kuo I, Perozich J, Lindahl R & Hempel J (1997) The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD⁺ and the Rossmann fold. *Nat Struct Biol* 4, 317–326.

Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the the 2-DDCT method. *Methods* 25, 402–408.

López-Otín C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F & Kroemer G (2016) Metabolic control of longevity. *Cell* 166, 802–821.

Lu CD, Itoh Y, Nakada Y & Jiang Y (2002) Functional analysis and regulation of the divergent spuABCDEFGH-spuI operons for polyamine uptake and utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 184, 3765–3773.

Madeo F, Bauera MA, Carmona-Gutierrez D & Kroemer G (2019) Spermidine: a physiological autophagy inducer acting as an anti-aging vitamin in humans? *Autophagy* 15, 165–168.

Madeo F, Eisenberg T, Pietrocola F & Kroemer G (2018) Spermidine in health and disease. *Science* 359, eaan2788.

Manuel J, Zhanel GG & de Kievit T (2010) Cadaverine suppresses persistence to carboxypenicillins in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 5173–5179.

Maráková K, Piešťanský J, Zelinková Z & Mikuš P (2020) Simultaneous determination of twelve biogenic amines in human urine as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases by capillary electrophoresis – tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 186, 113294.

Marchal S, Rahuel-Clermont S & Branlant G (2000) Role of glutamate-268 in the catalytic mechanism of nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* 39, 3327–3335.

McComb RB, Bond LW, Burnett RW, Keech RC & Bowers GN (1976) Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clin Chem* 22, 141–150.

Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Eldere JV, Glupczynski Y, Laethem YV, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM & Bамbeke F (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13, 560–578.

Mike SS, Wallace JM, Yun K, David TN & Tung TH (2007) In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* 75, 5313–5324.

Morris DR, Davis R & Coffino P (1991) A new perspective on ornithine decarboxylase regulation: Prevention of polyamine toxicity is the overriding theme. *J Cell Biochem* 46, 102–105.

Muñoz-Clares RA, Díaz-Sánchez AG, González-Segura L & Montiel C (2010) Kinetic and structural features of betaine aldehyde dehydrogenases: Mechanistic and regulatory implications. *Arch Biochem Biophys* 493, 71–81.

Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., & Díaz-Sánchez, Á. G. (2011) Crystallographic evidence for active-site dynamics in the hydrolytic aldehyde dehydrogenases. Implications for the deacylation step of the catalyzed reaction. *Chem-Biol Interact* 191, 137–146.

Muñoz-Clares RA & Casanova-Figueroa K (2019) The importance of assessing aldehyde substrate inhibition for the correct determination of kinetic parameters and mechanisms: the case of the ALDH enzymes. *Chem Biol Interact* 305, 86–97.

Nagasawa T, Kawabata Y, Tani Y & Ogata K (1976) Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric Biol Chem* 40, 1743–1749.

Nakada Y & Itoh Y (2003) Identification of the putrescine biosynthetic genes in *Pseudomonas aeruginosa* and characterization of agmatine deiminase and N-carbamoylputrescine amidohydrolase of the arginine decarboxylase pathway. *Microbiology* 149, 707–714.

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

Nowotarski SL, Woster PM & Casero RA (2013) Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev Mol Med* 15, e3.

Pegg AE (2013) Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem Res Toxicol* 26, 1782–1800.

Perola E, Walters WP & Charifson PS (2004) A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. *Proteins* 56, 235–249.

Pietrocola F, Castoldi F, Kepp O, Carmona-Gutierrez D, Madeo F & Kroemer G (2019) Spermidine reduces cancer-related mortality in humans. *Autophagy* 15, 362–365.

Pledge A, Huang Y, Hacker A, Zhang Z, Woster PM, Davidson NE & Casero RA Jr (2005) Spermine oxidase SMO(PAOh1), not N1-acetylpolyamine oxidase PAO, is the primary source of cytotoxic H₂O₂ in polyamine analogue-treated human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* 280, 39843–39851.

Prieto-Martínez FD, Arciniega M & Medina-Franco JL (2018) Molecular docking: current advances and challenges. *TIP Rev Espec Cien Quím-Biol* 21, 1–23.

Rennert OM, Frias J & Shukla JB (1976) Polyamine metabolism in cystic fibrosis. *Tex Rep Biol Med* 34, 187–197.

Riveros-Rosas H, González-Segura L, Julián-Sánchez A, Díaz-Sánchez ÁG & Muñoz-Clares RA (2013) Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chem-Biol Interact* 202, 51–61.

Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Moreno-Hagelsieb G & Muñoz-Clares RA (2019) Aldehyde dehydrogenase diversity in bacteria of the *Pseudomonas* genus. *Chem Biol Interact* 304, 83–87.

Rivett AJ & Tipton KF (1981) Kinetic Studies with rat-brain succinic-semialdehyde dehydrogenase. *Eur J Biochem* 117, 187–19.

Russell DH, Rosenblum MG, Beckerman RC, Durie BG, Taussig LM & Barnett DR (1979) Altered polyamine metabolism in cystic fibrosis. *Pediatr Res* 13, 1137–1140.

Sanders CC & Sanders Jr WE (1986) Type I β -lactamases of gramnegative bacteria: interactions with β -lactam antibiotics. *J Infect Dis* 154, 792–800.

Sangale A, Bhat V, Kelkar R & Biswas S (2021) Microbiology of ventilator-associated pneumonia in a tertiary care cancer hospital. *Indian J Crit Care Med* 25, 421–428.

Savoia D (2014) New perspectives in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Future Microbiol* 9, 917–928.

Schneider BL & Reitzer L (2012) Pathway and enzyme redundancy in putrescine catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 194, 4080–4088.

Schwarz C, Stekovic S, Wirth M, Benson G, Royer P, Sigrist SJ, Pieber T, Dammbrueck C, Magnes C, Eisenberg T, Pendl T, Bohlken J, Köbel T, Madeo F & Flöel F (2018) Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline. *Aging* 10, 19–33.

Seiler N (2004) Catabolism of polyamines. *Amino Acids* 26, 217–233.

Sharmin S, Sakata K, Kashiwagi K, Ueda S, Iwasaki S, Shirahata A & Igarashi K (2001) Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 228–235.

Sigurdsson G, Fleming RMT, Heinken A & Thiele I (2012) A systems biology approach to drug targets in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS ONE* 7, e34337.

Soda K (2015) Biological effects of polyamines on the prevention of aging-associated diseases and on lifespan extension. *Food Sci Technol Res* 21, 145–157.

Sousa da Silva AW & Vranken WF (2012) ACPYPE-AnteChamber PYthon Parser interface E. *BMC Res Notes* 5:367.

Stalon V, Wauven CV, Momin P & Legrain C (1987) Catabolism of arginine, citrulline and ornithine by *Pseudomonas* and related bacteria. *J Gen Microbiol* 133, 2487–2495.

Streeter K & Katouli M (2016) *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. *Infect Epidemiol Med* 2, 25–32.

Tabor CW & Tabor H (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* 49, 81–99.

Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N & the WHO Pathogens Priority List Working Group (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18, 318–327.

Tarique H, Bie T, Wenkai R, Najma R, Rahim D, Dildar H & Yulong Y (2017) Polyamines: therapeutic perspectives in oxidative stress and inflammatory diseases. *Amino Acids* 49, 1457–1468.

Teti D, Visalli M & McNair H (2002) Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J Chromatogr B* 781, 107–149.

Tong D & Hill JA (2017) Spermidine promotes cardioprotective autophagy. *Circ Res* 120, 1229–1231.

Trott O & Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31, 455–61.

Tsikis D, Erik H & Gorig B (2017) Spermidine for a long, dementia-free life? *Glob J Pharmaceu Sci* 2, 555576.

Valenzuela-Soto EM, Velasco-García R, Mújica-Jiménez C, Gaviria-González LI & Muñoz-Clares RA (2003) Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chem Biol Interact* 143–144, 139–148.

Vasiliou V & Nebert DW (2005) Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* 2, 138.

Vaz FM, Fouchier SW, Ofman R, Sommer M, & Wanders RJA (2000) Molecular and biochemical characterization of rat γ -trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase and evidence for the involvement of human aldehyde dehydrogenase 9 in carnitine biosynthesis. *J Biol Chem* 275, 7390–7394.

Velasco-García R, Chacón-Aguilar VM, Hervert-Hernández D & Muñoz-Clares RA (2003) Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram. *Chem Biol Interact* 143–144, 149–158.

Velasco-García R, Mújica-Jiménez C, Mendoza-Hernández G & Muñoz-Clares RA (1999) Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *P. aeruginosa*. *J Bacteriol* 181, 1292–1300.

Velasco-García R, Zaldívar-Machorro VJ, Mújica-Jiménez C, González-Segura L & Muñoz-Clares RA (2006) Disulfiram irreversibly aggregates betaine aldehyde dehydrogenase—A potential target for antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 341, 408–415.

Vojtechová M, Rodríguez-Sotres R, Valenzuela-Soto EM, Muñoz-Clares RA (1997) Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biochim Biophys Acta* 1341, 49–57.

Wang Z, Sun H, Yao X, Li D, Xu L, Li Y, Xu L, Li, Y, Tian S & Hou T (2016) Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein-ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Phys Chem Chem Phys* 18, 12964–12975.

Wargo MJ & Hogan DA (2009) Identification of genes required for *Pseudomonas aeruginosa* carnitine catabolism. *Microbiology* 155, 2411–2419.

Wargo MJ (2013) Choline catabolism to glycine betaine contributes to *Pseudomonas aeruginosa* survival during murine lung infection. *PLoS ONE* 8, e56850.

Waszkowycz B, Clark DE & Gancia E (2011) Outstanding challenges in protein-ligand docking and structure-based virtual screening. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science* 1, 229–259.

Wirth M, Schwarz C, Benson G, Horn N, Buchert R, Lange C, Köbe T, Hetzer S, Maglione M, Michael E, Märshenz S, Mai K, Kopp U, Schmitz D, Grittner U, Sigrist SJ, Stekovic S, Madeo F & Flöel A (2019) Effects of spermidine supplementation on cognition and biomarkers in older adults with

subjective cognitive decline (SmartAge)-study protocol for a randomized controlled trial. *Alzheimers Res Ther* 11, 36.

Wood PL, Khan MA & Moskal JR (2007) The concept of “aldehyde load” in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. *Brain Res* 1145, 150–156.

Wu W, Jin Y, Bai F & Jin S (2015) *Pseudomonas aeruginosa*. En YW Tang, M Sussman, D Liu, I Poxton, J Schwartzman (Eds.), *Molecular Medical Microbiology*, pp. 753-767. Londres, UK: Elsevier Ltd.

Wunderlichová L, Buňková L, Koutný M, Jančová P & Buňka F (2014) Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 13, 1012-1030.

Wyatt JW, Korasick DA, Qureshi IA, Campbell AC, Gates KS & Tanner JJ (2020) Inhibition, crystal structures, and in-solution oligomeric structure of aldehyde dehydrogenase 9A1. *Arch Biochem Biophys* 691, 108477.

Yang Z & Lu CD (2007) Functional genomics enables identification of genes of the arginine transaminase pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189, 3945–3953.

Yao X, He W & Lu CD (2011) Functional characterization of seven gamma-glutamylpolyamine synthetase genes and the bauRABCD locus for polyamine and beta-alanine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 193, 3923–3930.

Yao X, Li C, Zhang J & Lu CD (2012) γ -Glutamyl spermine synthetase PauA2 as a potential target of antibiotic development against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 5309–5314.

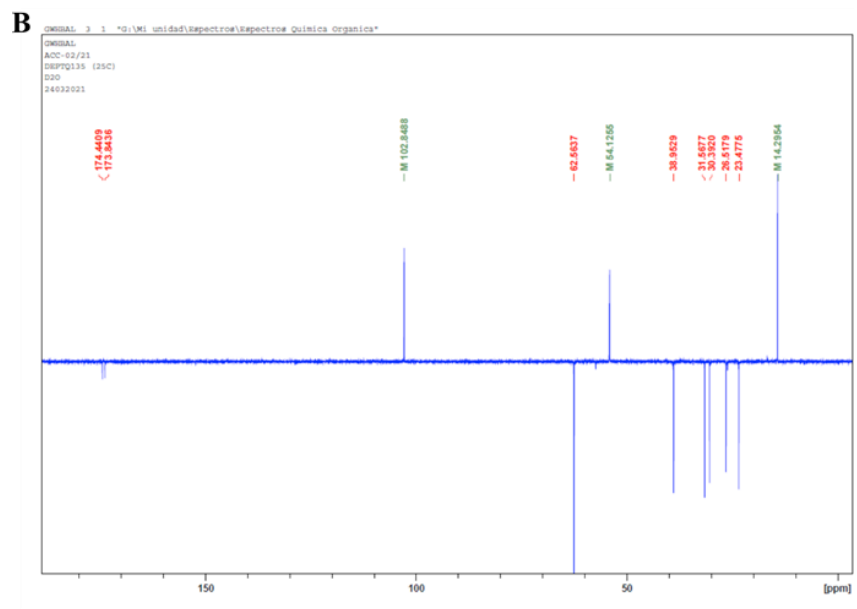
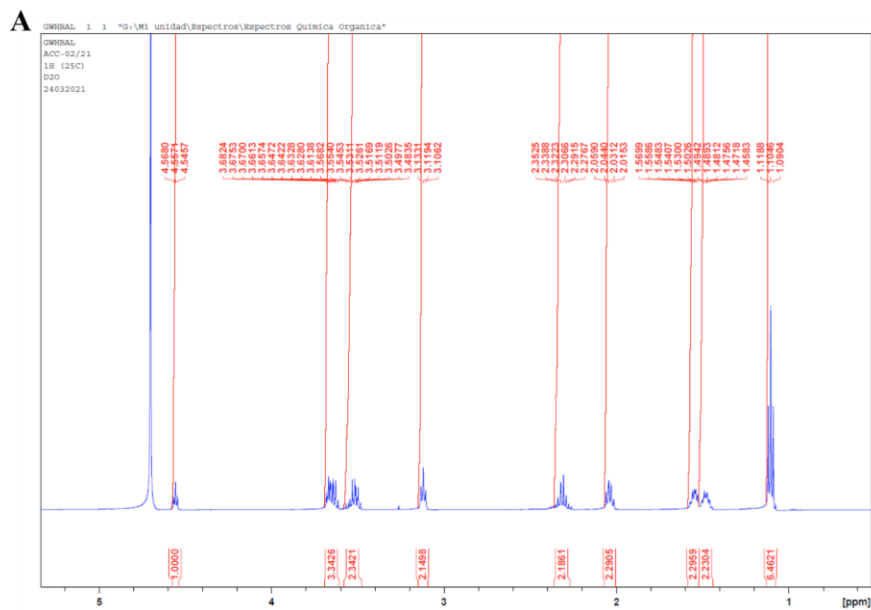
Zaldívar-Machorro VJ, López-Ortiz M, Demare P, Regla I & Muñoz-Clares, RA (2011) The disulfiram metabolites S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfoxide and S-methyl-N,N-diethylthiocarbamoyl sulfone irreversibly inactivate betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, both in vitro and in situ, and arrest bacterial growth. *Biochimie* 93, 286-295.

Zhou Y, Wang L, Yang F, Lin X, Zhang S & Zhao ZK (2011) Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD⁺-auxotrophic mutant. *Appl Environ Microbiol* 77, 6133–6140.

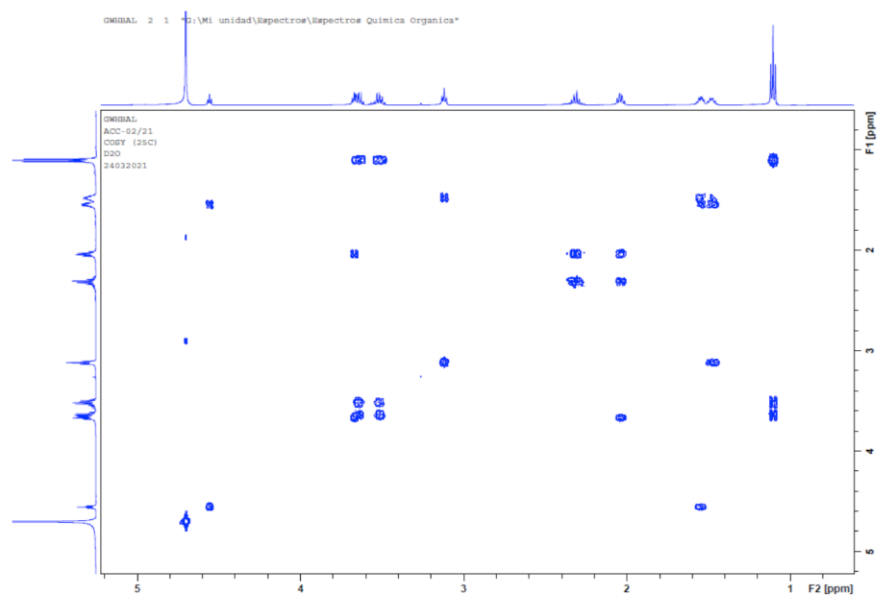
Zhu YQ, Zhu DY, Yin L, Zhang Y, Vornrhein C & Wang DC (2006) Crystal structure of human spermidine/spermine N¹-acetyltransferase (hSSAT): the first structure of a new sequence family of transferase homologous superfamily. *Proteins: Struct Funct Bioinformatics* 63, 1127–1131.

XIII. APÉNDICE I

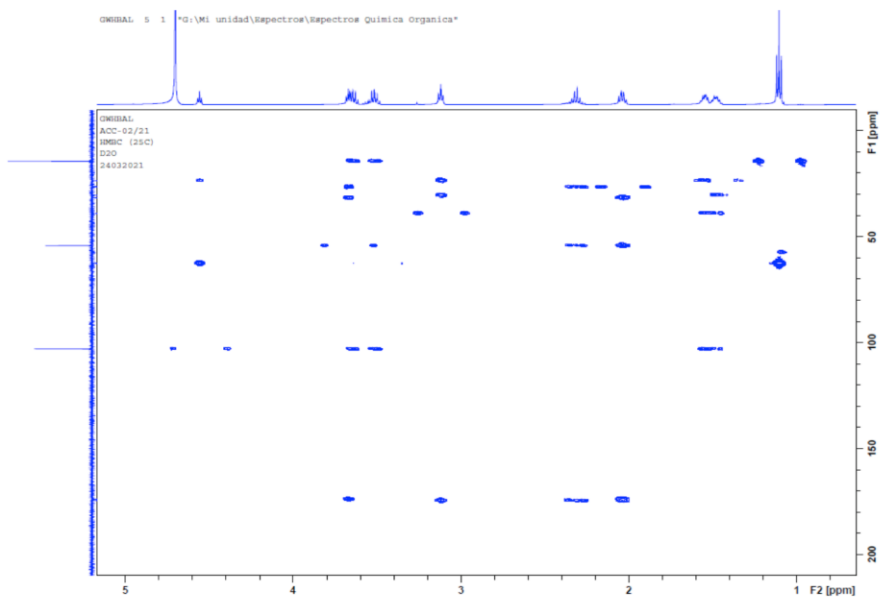
Datos espectroscópicos del producto de síntesis del 4-glutamaminobutiraldehído (GluABAL). (A) ^1H . (B) DEPTQ135. (C) COSY. (D) HMBC. (E) HSQC. Los espectros de RMN se adquirieron a 500 MHz en un instrumento Bruker Modelo Avance III HD con una sonda BBFO SMART de dos canales, utilizando D_2O como disolvente.



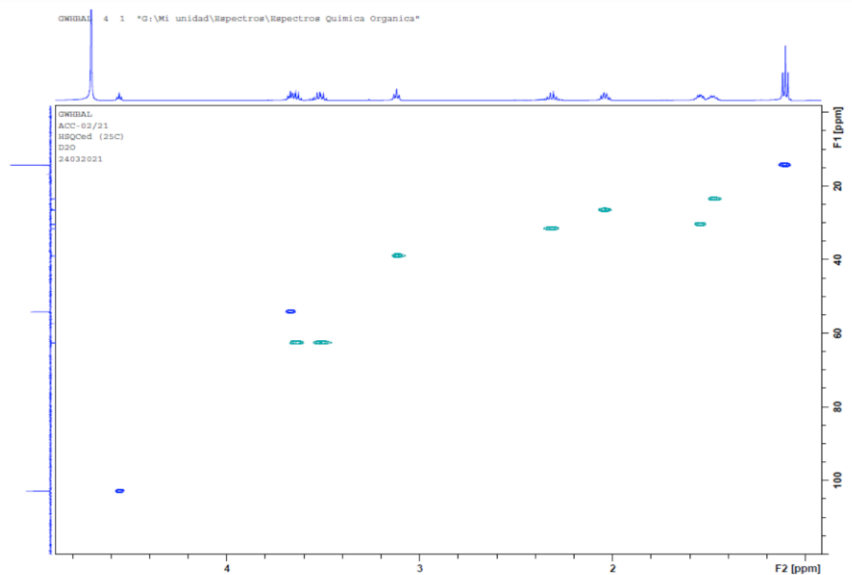
C



D

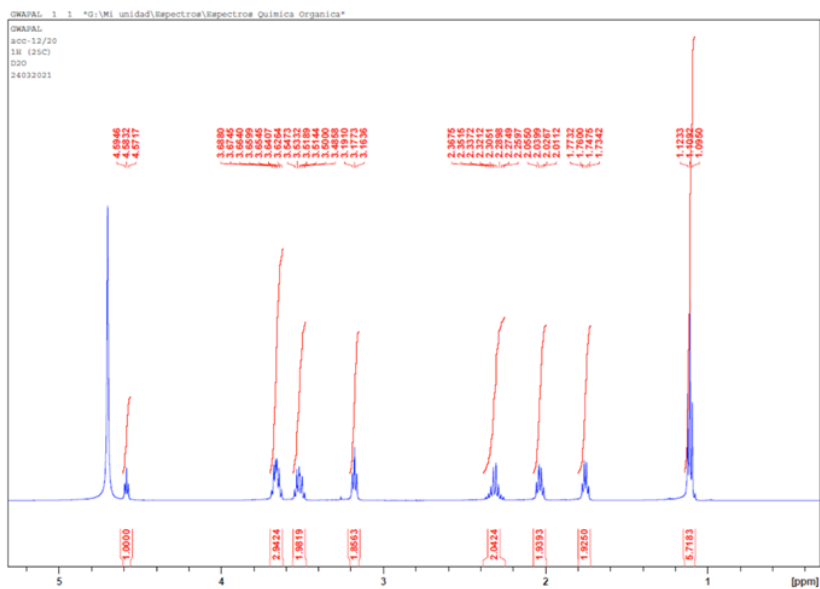


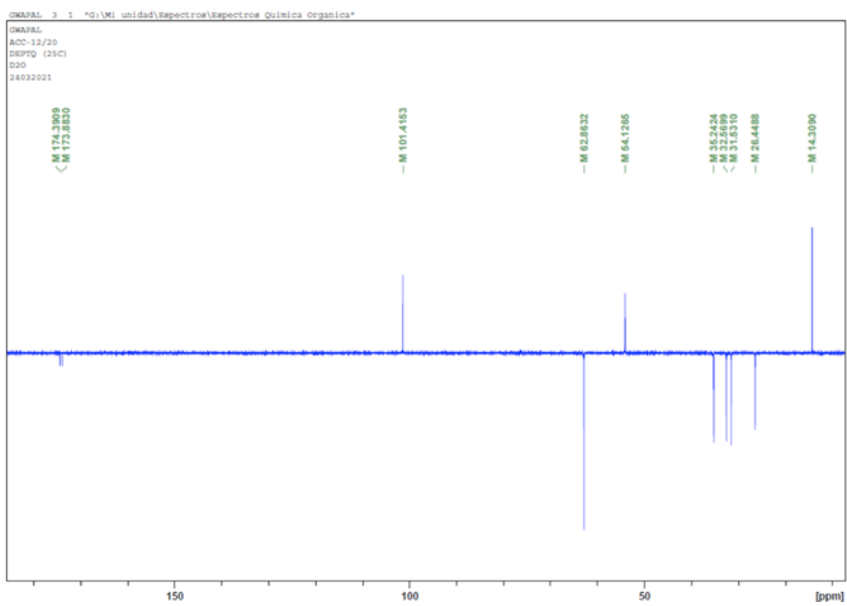
E



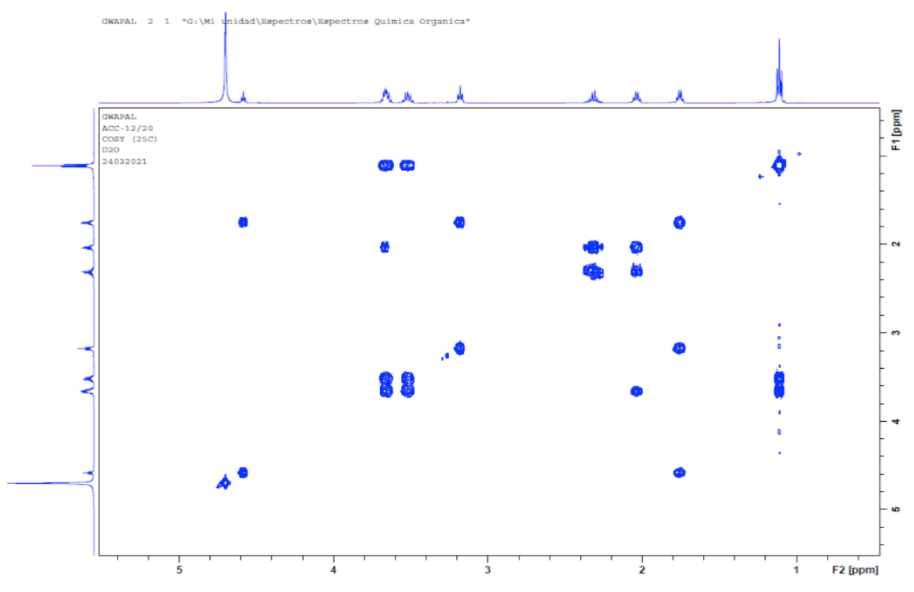
Datos espectroscópicos del producto de síntesis del 3-glutamylaminopropionaldehído (GluAPAL). (A) ^1H . (B) DEPTQ135. (C) COSY. (D) HMBC. (E) HSQC. Los espectros de RMN se adquirieron a 500 MHz en un instrumento Bruker Modelo Avance III HD con una sonda BBFO SMART de dos canales, utilizando D_2O como disolvente.

A

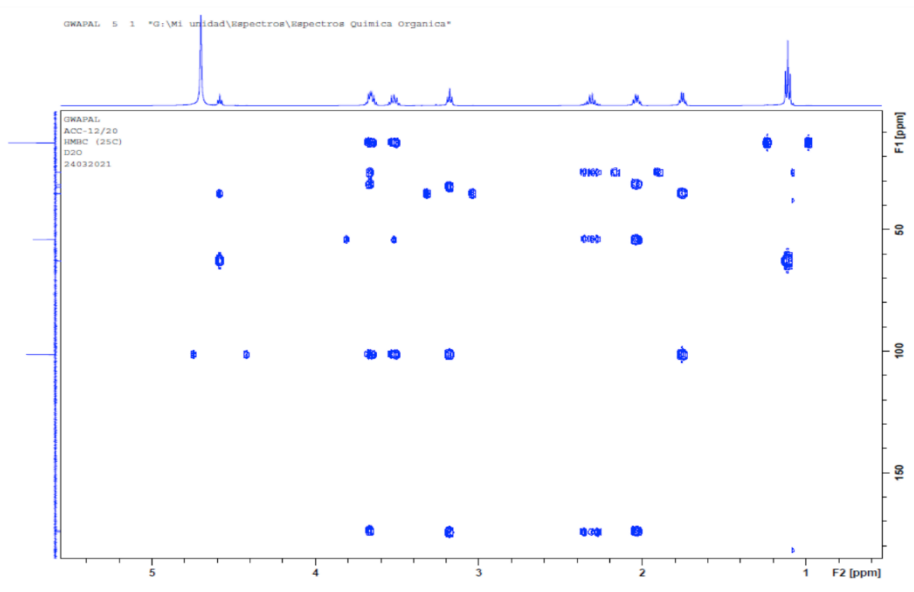


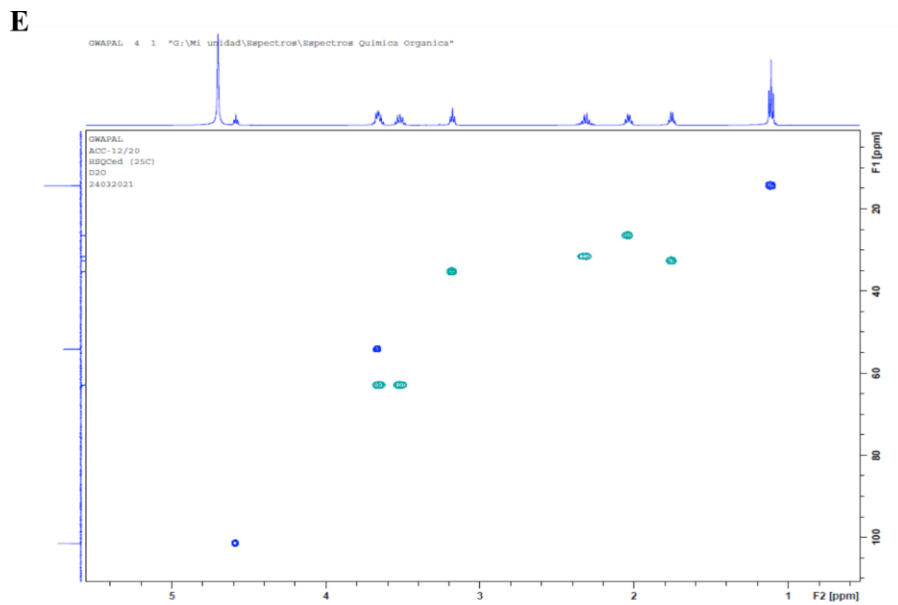
B

C

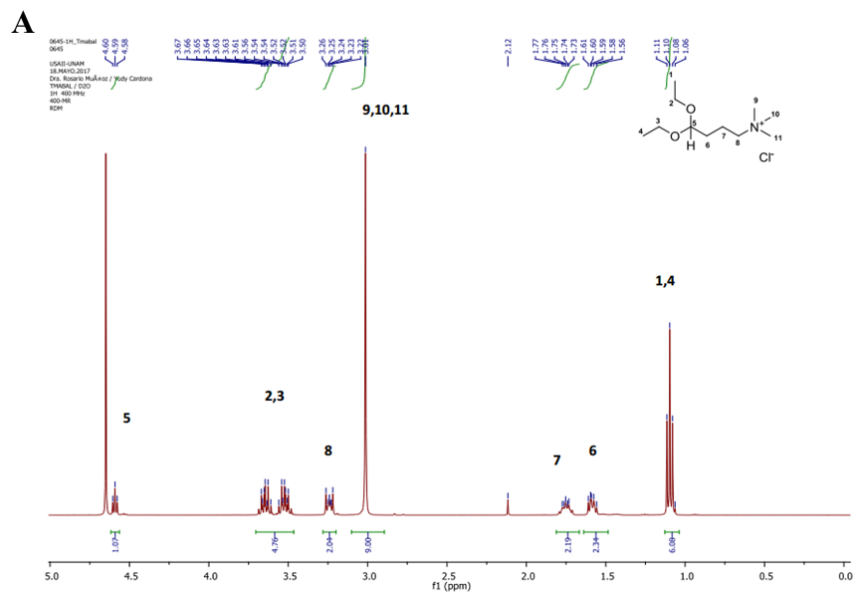


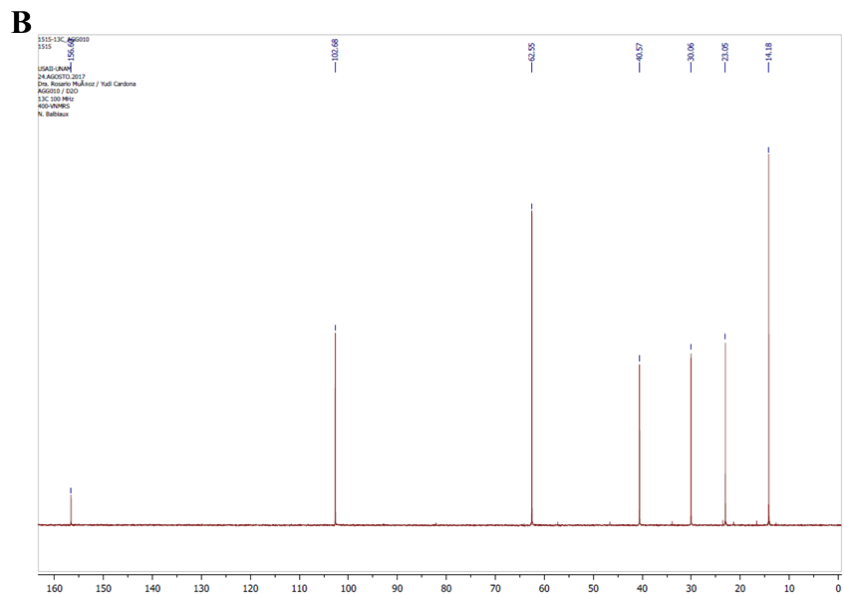
D





Datos espectroscópicos del producto de síntesis del 4-trimetilaminobutiraldehído (TMABAL). (A) ^1H . (B) ^{13}C . Los espectros de RMN se adquirieron a 400 MHz, utilizando D_2O como disolvente.






APÉNDICE II

Artículo publicado

Cardona-Cardona YV, Regla I, Juárez-Díaz JA, Carrillo-Campos J, López-Ortiz M, Aguilera-Cruz A, Mújica-Jiménez C & Muñoz-Clares R (2021). The critical role of the aldehyde dehydrogenase PauC in spermine, spermidine, and diamino propane toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*: Its possible use as a drug target. *FEBS J*. Doi:10.1111/febs.16277

The critical role of the aldehyde dehydrogenase PauC in spermine, spermidine, and diaminopropane toxicity in *Pseudomonas aeruginosa*: Its possible use as a drug target

Yudy V. Cardona-Cardona¹, Ignacio Regla², Javier Andrés Juárez-Díaz³, Javier Carrillo-Campos¹, Manuel López-Ortiz², Alejandro Aguilera-Cruz², Carlos Mújica-Jiménez¹ and Rosario A. Muñoz-Clares¹ 

1 Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

2 Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

3 Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Ciudad de México, México

Keywords

3-aminopropionaldehyde toxicity; bacterial growth inhibition; enzyme inhibition; polyamines degradation; substrate specificity

Correspondence

R. A. Muñoz-Clares, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México, México
Tel: +52 5556223718
E-mail: clares@unam.mx

(Received 8 July 2021, revised 29 October 2021, accepted 10 November 2021)

doi:10.1111/febs.16277

The opportunistic human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* exhibits great resistance to antibiotics; so, new therapeutic agents are urgently needed. Since polyamines levels are incremented in infected tissues, we explored whether the formation of a toxic aldehyde in polyamines degradation can be exploited in combating infection. We cloned the gene encoding the only aminoaldehyde dehydrogenase involved in *P. aeruginosa* polyamines-degradation routes, *PaPauC*, overexpressed this enzyme, and found that it oxidizes 3-aminopropionaldehyde (APAL) and 3-glutamyl-3-aminopropionaldehyde (GluAPAL) – produced in spermine (Spm), spermidine (Spd), and diaminopropane (Dap) degradation, as well as 4-aminobutyraldehyde (ABAL) and 4-glutamyl-4-aminobutyraldehyde (GluABAL) – formed in putrescine (Put) degradation. As the catalytic efficiency of *PaPauC* with APAL was 30-times lower than with GluAPAL, and GluAPAL is predominantly formed, APAL will be poorly oxidized ‘*in vivo*’. We found polyamines-induced increases in the *PaPauC* activity of cell crude-extracts and in the expression of the *PapauC* gene that were diminished by glucose. Spm, Spd, or Dap, but not Put, were toxic to *P. aeruginosa* even in the presence of other carbon and nitrogen sources, particularly to a strain with the *PapauC* gene disrupted. APAL, but not GluAPAL, was highly toxic even to wild-type cells, suggesting that its accumulation, particularly in the absence of, or low, *PaPauC* activity is responsible for the toxicity of Spm, Spd, and Dap. Our results shed light on the toxicity mechanism of these three polyamines and strongly support the critical role of *PaPauC* in this toxicity. Thus, *PaPauC* emerges as a novel potential drug target whose inhibition might help in combating infection by this important pathogen.

Abbreviations

ABAL, 4-aminobutyraldehyde; ALDH, aldehyde dehydrogenase; APAL, 3-aminopropionaldehyde; Cad, cadaverine; Dap, diaminopropane; GluABAL, 4-glutamyl-4-aminobutyraldehyde; GluAPAL, 3-glutamyl-3-aminopropionaldehyde; Put, putrescine; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative PCR; SEC, size-exclusion chromatography; Spd, spermidine; Spm, spermine.

Introduction

In humans, *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen that constitutes a growing health problem given the susceptibility to infection in the increasingly immunodepressed population [1]. Due to the high prevalence of antibiotic resistant strains of *P. aeruginosa* [2,3], new drugs against this pathogen are urgently needed [4]. The polyamines putrescine (Put), cadaverine (Cad), spermine (Spm), spermidine (Spd), and diaminopropane (Dap) are among the great variety of compounds in which *P. aeruginosa* can grow as its only carbon and nitrogen sources [5–7]. These polyamines are present in tissues infected by *P. aeruginosa* [8–10] and have been found in increased levels in physiologic fluids such as blood and urine in patients with cystic fibrosis [11–13] or cancer [14,15], the latter known to be highly susceptible to *P. aeruginosa* infections when under chemotherapy [1,16]. Moreover, increased Spm concentrations in the sputum of cystic fibrosis patients were reported [17].

On the basis of transcriptomics and growth phenotype analysis, polyamines were proposed to be degraded in *P. aeruginosa* as free forms [18–20] or, preferentially, as the glutamylated forms produced in a reaction catalyzed by glutamyl polyamine synthetases [6,7]. Put, Cad, Spd, and Dap induce the expression of several of the polyamines catabolism genes *pauA*, which encode glutamyl polyamine synthetase isoforms [6,7] and Spd and Put induce the expression of the *pauC* gene [6,20], which encodes the aldehyde dehydrogenase (ALDH; E.C. 1.2.1) PauC that presumably oxidizes the aminoaldehydes formed by transamination or by oxidation of polyamines [19,21,22]. In *P. aeruginosa*, PauC – formerly named KauB and here named PaPauC – may be the enzyme that oxidizes the ω -aminoaldehydes 3-aminopropionaldehyde (APAL) and 4-aminobutyraldehyde (ABAL), or the glutamylated derivatives of these aminoaldehydes 3-glutamyl-3-aminopropionaldehyde (GluAPAL) and 4-glutamyl-4-aminobutyraldehyde (GluABAL), all of them formed as intermediates in the degradation of polyamines (Scheme 1). However, the ability of PaPauC to oxidize these aminoaldehydes has not been tested yet. It is interesting that, in *P. aeruginosa*, the genes encoding the enzymes catalyzing the common steps of the polyamine degradative routes are redundant, except *PapauC*. Thus, PaPauC is the only aminoaldehyde dehydrogenase involved in all these routes [6]. In accordance, *PapauC* mutant cells cannot grow in Put, Cad, Spm, Spd, or Dap as sole nitrogen and carbon sources [5–7,18–20]. Hence, it could be expected that PaPauC inhibition will impair polyamines catabolism

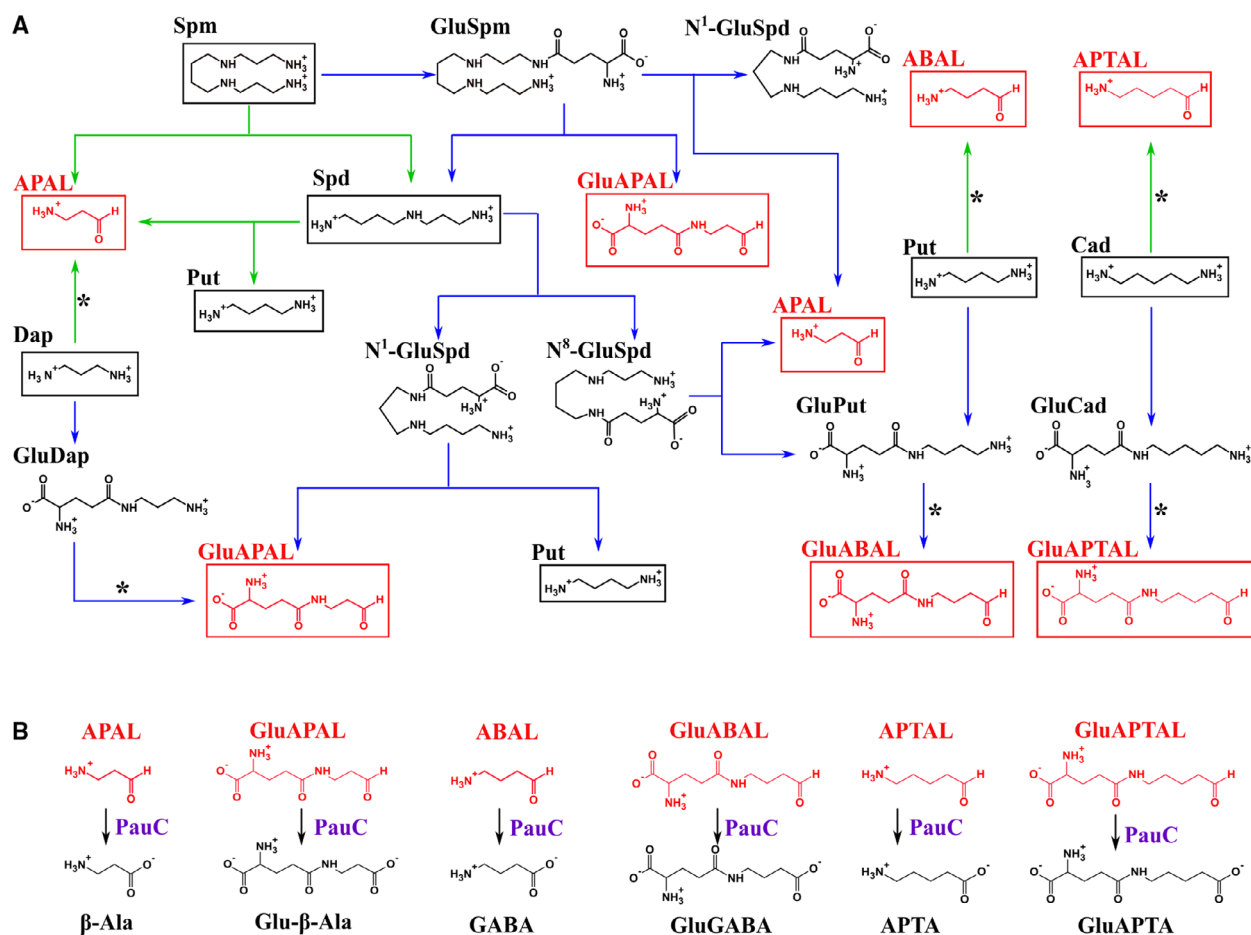
in *P. aeruginosa* cells, which presumably would compromise the pathogen growth given the importance of maintaining the balance between the synthesis and degradation of these essential compounds [23]. Furthermore, and perhaps even more significant, PaPauC inhibition would cause the intracellular accumulation of toxic aldehydes if polyamines were present in excess in the infected tissues, and therefore were being actively degraded, which could lead to bacterial death. Because of this, we hypothesized that PaPauC might be a novel target for antimicrobial agents. Previously, another enzyme participating in polyamine catabolism in *P. aeruginosa* – the glutamyl polyamine synthetase PauA2 – was proposed as a drug target [24].

This work has the double aim of getting a better understanding of the role that PaPauC plays in polyamines catabolism in this important pathogen and of laying the foundation for future efforts toward its specific inhibition. For that, we undertook the cloning and overexpression of the *PapauC* gene, and the purification of the recombinant PaPauC enzyme, as well as its kinetic characterization with four of the five ω -aminoaldehydes proposed to be formed in polyamines degradation, including GluAPAL and GluABAL that have not been tested before as substrates of any ALDH. Also, we tested the effects of the polyamines and these ω -aminoaldehydes on the *in vitro* growth of *P. aeruginosa* wild-type and mutant cells with the encoding PaPauC gene disrupted. We report here the substrate preferences of PaPauC and discuss the important implications of this enzyme kinetics on the observed Spd, Spm, and Dap toxicity, which we propose is mainly due to the APAL formed in their degradation and poorly oxidized by PaPauC. We conclude that inhibition of PaPauC may help in counteracting infection by *P. aeruginosa*, and, therefore, this enzyme emerges as a novel potential drug target.

Results

Chemical synthesis of GluAPAL and GluABAL diethyl acetals

GluAPAL and GluABAL are not commercially available, and, as far as we know, there are no reports about their synthesis; so, we developed a new method described in detail in the Material and Methods section. GluAPAL and GluABAL were synthesized as their diethyl acetals forms in a two-stage reaction depicted in Scheme 2. First, N-(benzyloxycarbonyl)-L-glutamic acid (compound 1) and benzyl alcohol were used to synthesize N-(benzyloxycarbonyl)-L-glutamic acid α -monobenzyl ester (compound 2), which is a

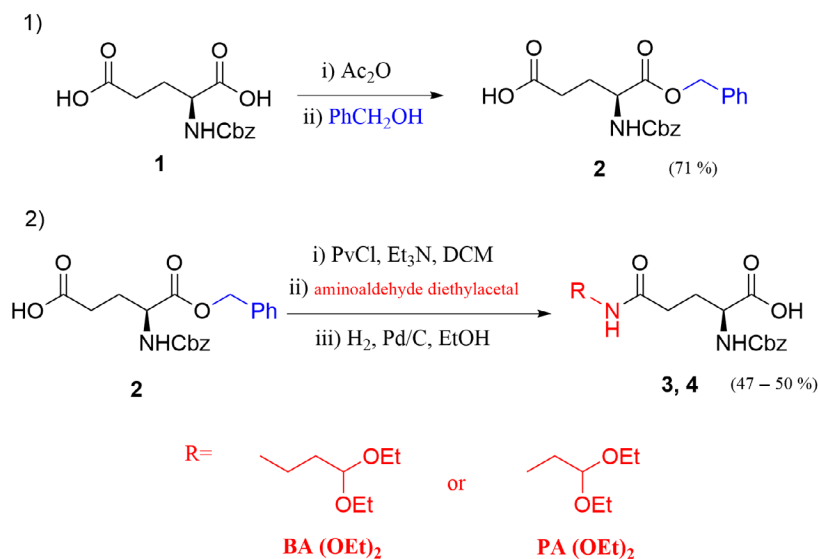


Scheme 1. (A) Proposed routes of formation of aminoaldehydes and glutamylated aminoaldehydes from polyamines in *P. aeruginosa*. Green lines indicate degradation of free polyamines and blue lines indicate degradation of glutamylated polyamines. Polyamines are enclosed in black boxes and ω -aminoaldehydes in red boxes. * indicates that the aminoaldehyde can be formed either by transamination or by oxidation with an FAD-dependent amine oxidase. (B) Possible oxidation of ω -aminoaldehydes and glutamyl- ω -aminoaldehydes by *PaPauC*. The resulting ω -amino acids of three, four or five carbons will be further degraded to acetyl-CoA, succinate, or glutarate, respectively. Abbreviations: APAL, 3-aminopropionaldehyde; ABAL, 4-aminobutyraldehyde; APTAL, 5-aminopentaldehyde; β -Ala, β -alanine; GABA, γ -aminobutyrate; APTA, γ -aminopentanoate. The prefix Glu indicates the glutamylated forms.

glutamic acid derivative with the α -amino and α -carboxylic groups protected and the side chain carboxyl group free. Then, compound 2 was mixed with either APAL diethyl acetal or ABAL diethyl acetal in the presence of pivaloyl chloride and triethylamine as an activating agent. In this reaction, pivaloyl chloride forms a mixed anhydride with the free carboxylic acid group of compound 2 to activate the carbonyl group, which can then be substituted by the respective aminoaldehyde diethyl acetal. Finally, the protecting groups were removed by catalytic hydrogenation. The final products were characterized by ^1H , ^{13}C , DEPTQ135, COSY, HMBC, and HSQC NMR analyses, and the spectra are shown in Fig. S1 and Fig. S2.

Synthesis of GluABAL diethyl acetal gave 0.44 g (47%) of solid with a melting point of 170 °C dec and chemical shifts: ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 4.56 (1H, t, J = 5.5 Hz), 3.68 (1H, t, J = 5.3 Hz), 3.68-3.61 (3H, m), 3.58-3.48 (2H, m), 3.12 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.37-2.26 (2H, m), 2.07-2.01 (2H, m), 1.57-1.52 (2H, m), 1.51-1.44 (2H, m), 1.11 (6H, t, J = 7.1 Hz, H-20). ^{13}C NMR (D_2O , 125 MHz) δ 174.4, 173.8, 102.8, 62, 54.1, 38.9, 30.3, 31.56, 30.3, 26.51, 23.4, 14.2.

Synthesis of GluAPAL diethyl acetal gave 0.8 g (50%) of solid with a melting point of 175 °C dec and chemical shifts: ^1H NMR (D_2O , 500 MHz) δ 4.59 (1H, t, J = 5.8 Hz), 3.74-3.61 (3H, m), 3.58-3.48 (2H, m), 3.18 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.39-2.25 (2H, m), 2.04 (2H,



Scheme 2. Synthesis of glutamyl aminobutyraldehyde (GluABAL, 3) and glutamyl aminopropionaldehyde (GluAPAL, 4) diethyl acetals. 1, N-(benzyloxycarbonyl)-L-glutamic acid 2, N-(benzyloxycarbonyl)-L-glutamic acid α -monobenzyloxy ester. Ac₂O, acetic anhydride; PhCH₂OH, benzyl alcohol. PvCl, pivaloyl chloride; Et₃N, triethylamine; DCM dichloromethane; H₂ Pd/C catalytic hydrogenation; EtOH ethanol; BA(OEt)₂, butyraldehyde diethyl acetal, PA(OEt)₂, propionaldehyde diethyl acetal.

q, J = 7.4 Hz), 1.76, (2H, q, J = 6.5 Hz), 1.11 (6H, t, J = 7.0 Hz). ¹³C NMR (D₂O, 125 MHz) δ 174.3, 173.8, 101.4, 62.8, 54.1, 35.2, 32.5, 31.5, 26.4, 14.3.

Cloning of *PapauC* and confirmation of the *PapauC* defective mutant

The *PapauC* gene was cloned as described in Materials and Methods section. The confirmation of the insertional mutation *PA5312-A09::ISlacZ/hah* – schematically shown in Fig. 1A – was carried out by PCR analysis as described in the Material and Methods section. The results are shown in Fig. 1B. As expected, the band corresponding to the intact *PapauC* gene of 1494 pb was observed when the genomic DNA (gDNA) from the wild-type strain was used as template, but absent when the template was the gDNA from the mutant strain (hereafter referred as *pauC::ISlacZ*). On the contrary, the band of 371 pb corresponding to the region between the forward *ISlacZ* and forward *pauC* primers was present in the mutant strain and absent in the wild-type strain. The location and organization of the *PapauC* gene in the *P. aeruginosa* genome show that – different from *Escherichia coli* where the *PapauC* ortholog gene (named *puuC*) belongs to the well-defined operon for putrescine utilization – it does not form part of an operon. Two neighbors, but not contiguous genes, are also involved in the catabolism of polyamines: *PA5309* (named *pauB4*) in the upward 5' region – which encodes an FAD-dependent oxidoreductase that catalyzes the formation of Put from Spd [7] – and *PA5313* downward in the 3' region – which encodes a transaminase. Although both genes are induced by Put and Spd [6,20], both have their own promoters [7,20],

and therefore, the insertional mutation *PA5312-A09::ISlacZ* would not have any polar effect on the expression of *PA5309* nor *PA5313*, neither on the expression of any other polyamine catabolic gene. Thus, the phenotypic features of the mutant *pauC::ISlacZ* strain carrying this insertion can be only ascribed to its defective *pauC* gene.

Expression, purification and association state of the recombinant *PaPauC* enzyme

Recombinant *PaPauC* was purified to homogeneity. The pure recombinant enzyme was stable for several months when stored at -70 °C under the conditions specified in the Material and Methods section. The subunit molecular mass of the recombinant *PaPauC* estimated by SDS/PAGE was 54 kDa (Fig. 2A), a value close to the 56.6 kDa predicted by the amino acid sequence of the recombinant protein. The pure recombinant *PaPauC* eluted in size-exclusion chromatography (SEC) as a single, symmetric peak (Fig. 2B), with an elution volume corresponding to a tetramer of 168 kDa, a value between 113 kDa, which is the predicted value if the protein were dimeric, and 226 kDa, which is the predicted value if the protein were tetrameric. The SEC result therefore would be consistent with the protein being a trimer. However, we concluded that the native association state of *PaPauC* is a tetramer given that: (a) in the large number of studied ALDHs only dimeric and tetrameric enzymes have so far been found, with exception of the hexameric ALDH4 [25], which is consistent with the mode of association of the subunits in a dimer, being the tetramers dimers of dimers and the hexamers trimers of

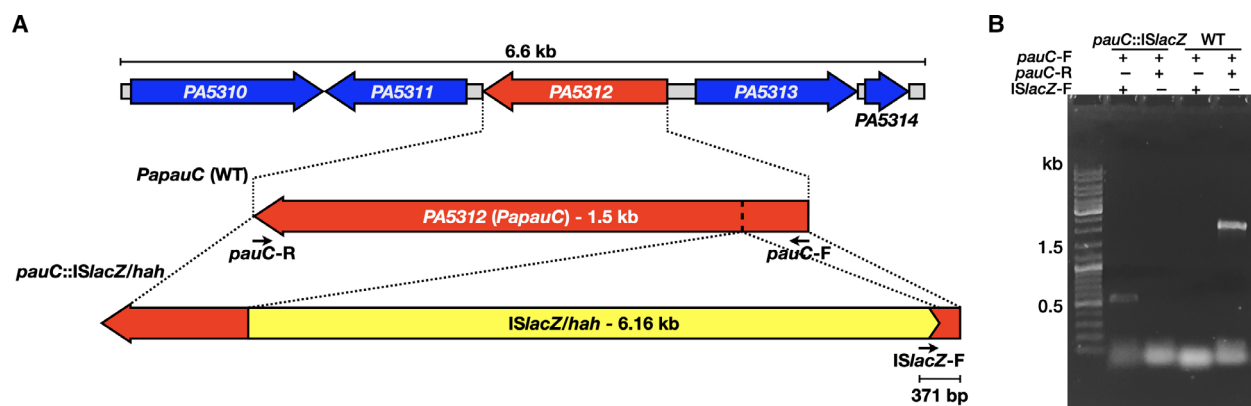


Fig. 1. Confirmation of the *ISlacZ/hah* transposon insertion in the *pauC::ISlacZ* mutant strain. (A) Schematic representation of the insertion site of the *ISlacZ/hah* transposon (6.16 kb) within the *PapauC* coding sequence (1.5 kb) resulting in the *pauC::ISlacZ/hah* mutant one, as reported [66]. The genomic region of the wild type strain (6.6 kb) where the *PA5312* (*pauC*) and four neighboring genes are located is shown to indicate the lack of polar effects of the transposon insertion in *PapauC* on its neighboring genes. Intergenic regions are represented as gray boxes. (B) Agarose electrophoresis (GelRed stained) analysis from the PCR amplification using different combinations of primers (*PapauC* specific primers: *pauC-F* and *pauC-R*; *ISlacZ/hah* primer: *ISlacZ-F*) and gDNA from *pauC::ISlacZ* or MPAO1 (WT) strains as template. The alignment site of each primer is indicated in (A) as well as the expected amplification product size. From the *pauC::ISlacZ* strain, a PCR product with the expected size was only detected when *pauC-F* and *ISlacZ-F* primers were used, confirming the transposon insertion as shown in (A); from the WT, the only amplification product detected was when the *PapauC* primers were used, indicating the absence of any transposon insertion.

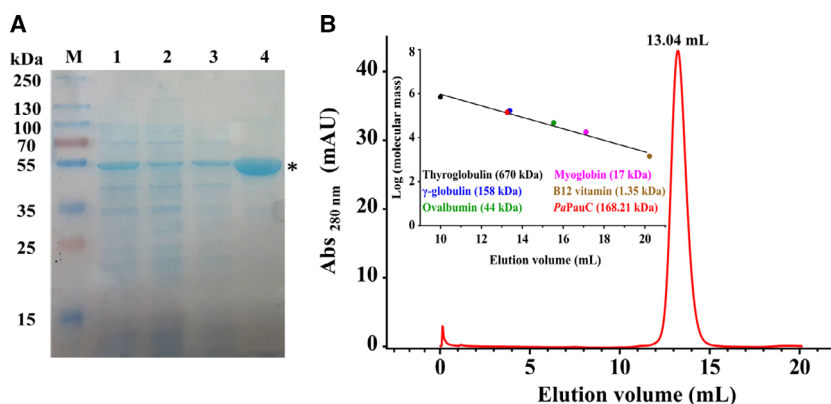


Fig. 2. *PaPauC* purification and oligomeric state. (A) SDS/PAGE gel showing the results of *PaPauC* purification. Lanes: M, molecular mass markers (Thermo Scientific); 1, supernatant of crude cells extracts; 2, protein not bound to the metal-affinity column; 3, affinity column wash; 4, pooled 1 to 4 eluted fractions. (B) Elution profile of *PaPauC* protein from SEC. Pure recombinant *PaPauC* was in 50 mM potassium phosphate, pH 7.0 buffer containing 50 mM KCl, 10% (v/v) glycerol and 10 mM 2-mercaptoethanol. Inset: SEC-column calibration curve obtained using the indicated molecular mass standards (BioRad).

dimers; (b) this anomalous elution from SEC has been observed before – for instance, with the BADH from *P. aeruginosa*, which was initially considered to be a dimer [26] but then proved to be a tetramer [27,28] – and is probably related to the form of the protein or to nonspecific interactions with the column matrix; and (c) the *PaPauC* crystal structure of the protein determined by us (PDD code 6B4R) clearly revealed its tetrameric nature and the characteristic folding of the ALDH enzymes.

Oxidation of APAL, GluAPAL, ABAL, and GluABAL by recombinant *PaPauC*

A significant ALDH activity with ABAL as the substrate has been previously reported in crude extracts of *P. aeruginosa* cells grown in Put or agmatine as only carbon and nitrogen sources [5]. It is likely that most of this ALDH activity came from the *PaPauC* enzyme given the higher activity in cells grown in these compounds than in cells grown in glutamate. The kinetic

characterization of this enzyme requires studying it in a pure form to avoid any possible contamination with other ALDH enzymes that might be present in crude cell extracts. For this reason, we cloned the *PapauC* gene, obtained the pure recombinant *PaPauC* enzyme and investigated *PaPauC* specificity and catalytic efficiency with all the ω -aminoaldehydes proposed to be formed in the routes of Spm, Spd, Dap, or Put degradation in *P. aeruginosa*: APAL, ABAL, and the glutamyl- ω -aminoaldehydes GluAPAL and GluABAL. To the best of our knowledge, this is the first report of the testing of GluAPAL and GluABAL as substrates of any ALDH enzyme, since it is the first time these compounds have been synthesized.

As expected, the recombinant *PaPauC* enzyme oxidizes APAL, GluAPAL, ABAL, and GluABAL but with important differences in catalytic efficiency. The saturation kinetics of these aldehydes at fixed 0.6 mM NAD^+ are depicted in Fig. 3A to E, and the estimated kinetic parameters are given in Table 1. NAD^+ was used as the coenzyme since *PaPauC* does not use NADP^+ (results not shown). From a physiological point of view, the most relevant result is the big

difference in the saturation kinetics of *PaPauC* with APAL and GluAPAL, being GluAPAL the best substrate and APAL the worst. Indeed, of all the aldehydes tested, APAL has the lowest V_{max} , the highest K_m , and, consequently, the lowest V_{max}/K_m (Table 1 and Fig. 3). Both APAL and GluAPAL are formed during the degradation of Spd, Spm, and Dap [6,7], but GluAPAL would be oxidized at a rate 30 times higher than APAL if both were at the same concentration, as indicated by the ratio of their respective V_{max}/K_m values (Fig. 3F). This difference would be considerably higher *in vivo* if GluAPAL were formed in a greater proportion than APAL, as it is likely to occur since the glutamylated forms of Spm and Spd are degraded preferentially to their free forms. Indeed, Yao *et al.* [6] proposed that only the glutamylation pathway is involved in polyamine degradation. However, our results described below support the degradation of free polyamines and the formation of APAL, with important implications for the viability of the cells. Also, oxidation of APAL by *PaPauC* would be diminished, although to a lesser degree, if Put were degraded at the same time as Spm, Spd, or Dap. The

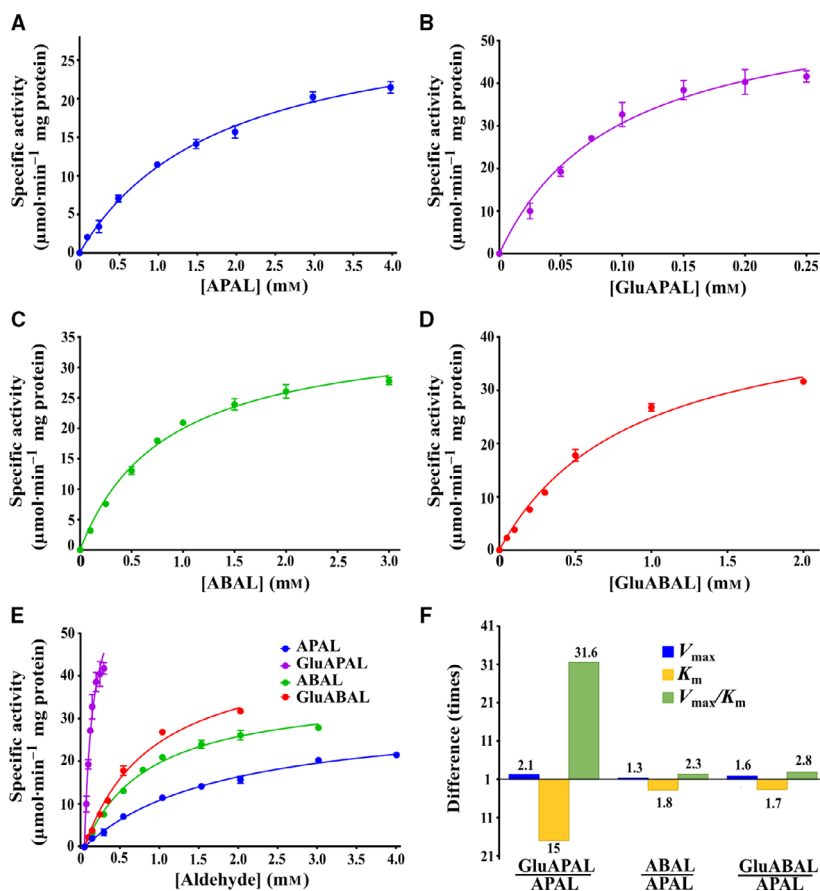


Fig. 3. Saturation kinetics of recombinant *PaPauC* with ω -aminoaldehydes and glutamyl-aminoaldehydes. Initial velocities were obtained at 30 °C, pH 8.0, and 0.6 mM NAD^+ . Points are the average of the data of at least two independent experiments. The kinetic parameters \pm the standard errors were estimated by nonlinear regression fits of the experimental data to the Michaelis-Menten equation (Eq. 1). (A) 3-Aminopropionaldehyde (APAL) (B) 3-Glutamyl-aminopropionaldehyde (GluAPAL). (C) 4-Aminobutyraldehyde (ABAL). (D) 4-Glutamyl-aminobutyraldehyde (GluABAL). (E) Comparison of the saturation curves of the four aldehydes tested. Note that the range of the aldehyde concentration used in the saturation kinetics differs according to the affinity of the enzyme for each of the aldehydes tested. (F) Ratio of the kinetic parameters for GluAPAL, ABAL, and GluABAL to those of APAL.

Table 1. Kinetic parameters of PaPauC using free and glutamylated ω -aminoaldehydes as variable substrates. Initial velocities were obtained at 30 °C, potassium phosphate buffer pH 8.0, variable aldehyde concentrations and 0.6 mM NAD⁺. The kinetic parameters were estimated by nonlinear regression fit of the experimental data to the Michaelis-Menten equation (Eq. 1). The symbol \pm indicates the error (standard deviation) of the estimated values. V_{\max} and K_m values are given as U/mg protein and mM, respectively.

Kinetic parameter	APAL	GluAPAL	ABAL	GluABAL
V_{\max}	29 \pm 1	60 \pm 4	37 \pm 1	47 \pm 2
K_m	1.50 \pm 0.10	0.10 \pm 0.01	0.84 \pm 0.06	0.89 \pm 0.07
V_{\max} / K_m	19	600	44	53

latter due to the competition of APAL with the ABAL and GluABAL formed in Put degradation, which have V_{\max}/K_m values more than two times higher than that of APAL (Fig. 3F). The same would occur if agmatine were degraded, given that it produces Put. Therefore, it is more probable that the APAL formed in *P. aeruginosa* cells as an intermediate of the Spm, Spd, and Dap degradation pathways is poorly oxidized by PaPauC, and that APAL intracellular concentrations would build up if these polyamines were actively degraded, as might occur during infection.

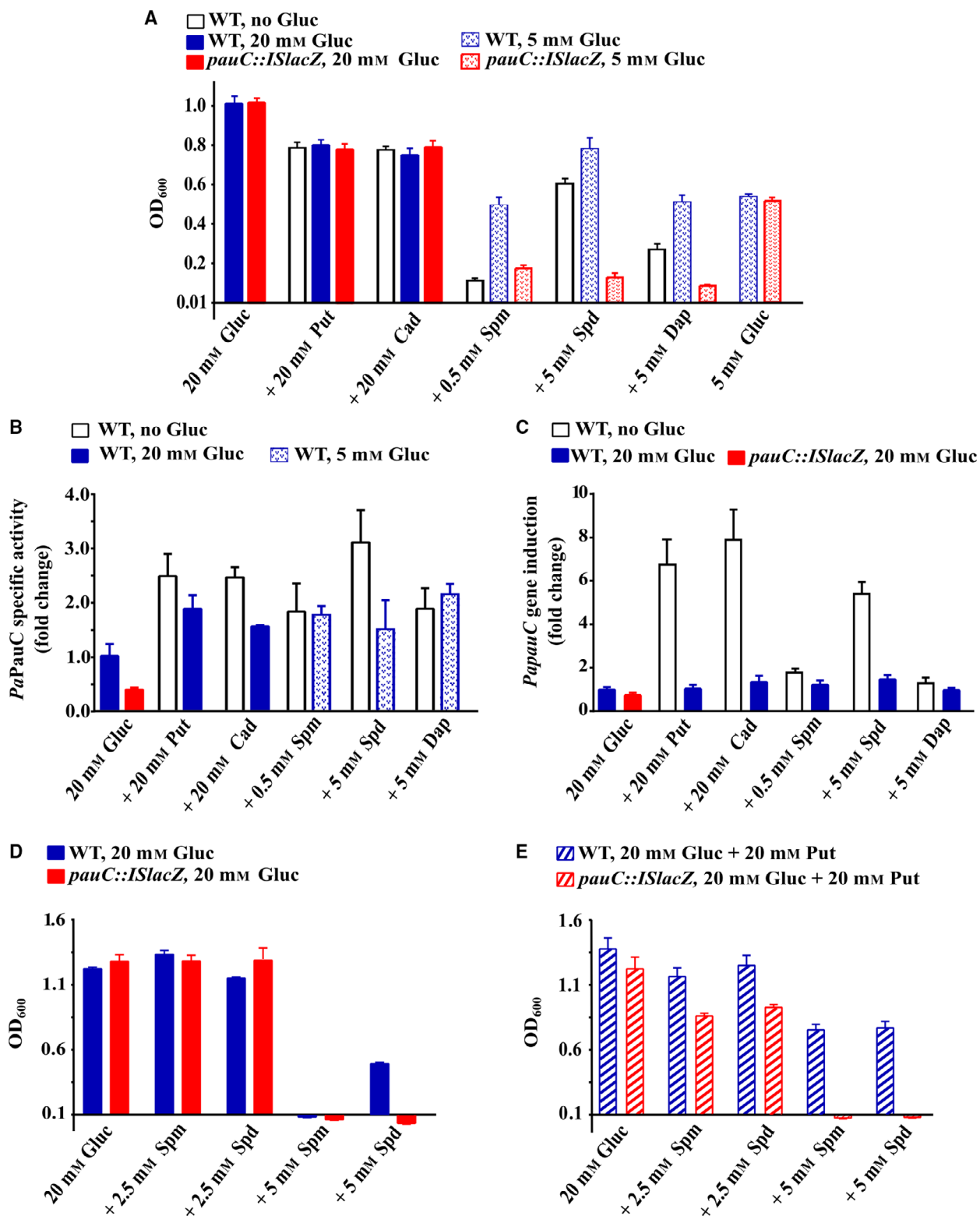
Growth of *P. aeruginosa* in polyamines and PaPauC activity in cell crude extracts

To further assess the *in vivo* capacity of PaPauC to oxidize the different free or glutamylated aminoaldehydes formed during polyamines degradation, we investigated the PaPauC activity exhibited by crude extracts of *P. aeruginosa* cells grown in polyamines as the sole carbon and nitrogen sources, or in polyamines plus glucose (Gluc) and NH₄Cl as additional sources of carbon and nitrogen. Put and Cad were used at 20 mM because higher concentrations are physiologically unlikely, while Spd and Dap were at 5 mM and Spm at 0.5 mM since higher concentrations of the latter three polyamines inhibited growth, consistent with their known cytotoxicity [29]. At the concentrations used, all polyamines could support the growth of *P. aeruginosa* MPAO1 cells as the sole carbon and nitrogen sources (Fig. 4A and Table 2). Thus, we could use the cells crude extracts to measure their ALDH activity toward 1 mM ABAL or 1 mM APAL as substrates and compare this activity with that of cells grown in Gluc plus ammonium. When the cells were grown only in Gluc – regardless of its concentration 5 or 20 mM – plus 15 mM NH₄Cl, the ALDH activity toward ABAL or APAL was very small, suggesting a low basal expression of the *PapauC* gene, or a null expression of this gene and the presence of another ALDH with a low activity toward these aldehydes. ALDH activity significantly increased in cells grown in polyamines as

the sole carbon and nitrogen source (Fig. 4B and Table 2), in accordance with previous reports of the induction of the *PapauC* gene by agmatine, Put, or Spd [6,20]. Based on the increases in ALDH activity in cells grown in the presence of Spm and Dap, it is possible to deduce that these polyamines may cause induction of the *PapauC* gene. However, the low concentration of Spm, 0.5 mM, used in these experiments supports very little bacterial growth, so that these results are not conclusive.

The natural media in which *P. aeruginosa* can grow – human tissues, for instance – contain other carbon and nitrogen sources besides polyamines. Therefore, in order to evaluate the extent of the polyamines-induced increases in PaPauC activity *in vivo*, we measured this activity in crude extracts of cells grown in polyamines plus Gluc at the same concentration as the polyamine plus 15 mM NH₄Cl. The growth in Put or Cad in the presence of Gluc was similar to that in the absence of Gluc. In the case of Spm, Spd, or Dap, cells growth was even higher, probably because the lower Gluc concentration in their growth media. However, the polyamines-elicited increases in ALDH activity toward APAL and ABAL were lower than in the absence of Gluc, although still higher than those determined in cells grown only in Gluc plus ammonium (Fig. 4B and Table 2). This suggests that the expression of *PapauC* is subjected to catabolic repression by Gluc and presumably by also other carbon sources that the bacterium may encounter in the infection sites.

To confirm the induction of the *PapauC* gene by polyamines and to explore the catabolic repression by Gluc we assessed its relative expression under different nutritional conditions by RT-qPCR assays (Fig. 4C). We found that the relative expression of *PapauC* increases when cells were grown in Put and Spd as previously reported [6]. We also found increases, although smaller ones, in cells grown in Spm (even at the low concentration of this polyamine at which the cells were grown) or Dap. The presence of 20 mM Gluc in the media containing polyamines exerts an important repression of *PapauC* transcription – lesser again in the



case of Spm probably for the reasons mentioned above – which explains the results of the enzyme activity in crude extracts described above. In the case of the cells

grown in Dap, the *PapauC* expression appears not to be significantly repressed by glucose, also in agreement with the enzyme activity results shown in Fig. 4B.

Fig. 4. Growth of *P. aeruginosa* cells in polyamines and specific activity of *PaPauC* in crude extracts of these cells. (A) Growth of wild-type and *pauC::ISlacZ* mutant. The cells were grown for 24 h at 37 °C and 200 r.p.m. in a modified minimal medium M9 and the indicated growth substrates. (B) Specific activity of *PaPauC* in crude extracts of *P. aeruginosa* wild-type cells grown in polyamines in the absence or presence of glucose. Enzyme activity was determined at 30 °C, pH 8.0, 1 mM APAL and 0.6 mM NAD⁺. Bars are the mean value of at least two different experimental determinations and represent the fold increase in specific activity with respect to that observed in cells grown at 20 or 5 mM Gluc plus 15 mM NH₄Cl. (C) Induction of *PapauC* gene expression of *P. aeruginosa* wild-type cells grown in polyamines in the absence or presence of glucose; the mutant strain *PapauC* expression was only determined in cells grown in glucose plus ammonium. Transcript accumulation was determined by RT-qPCR. Bars are the mean value of at least three different experimental determinations and represent fold change in transcript accumulation. (D) Effects of Spm and Spd at the indicated concentrations on *P. aeruginosa* wild-type and *pauC::ISlacZ* mutant cells growth in modified minimal media M9 containing 20 mM Gluc plus 15 mM NH₄Cl. (E) Same as (D), but the media were supplemented with 20 mM Put. Bars are the mean value of at least two different experimental determinations, and the vertical lines indicate the mean standard deviation.

As expected, the *pauC::ISlacZ* mutant strain devoid of a functional *PapauC* gene could not grow in any of the polyamines as the only carbon and nitrogen sources (Table 2), which confirms that the *PaPauC* activity is essential for polyamines degradation [5,7,20]. Moreover, when the *pauC::ISlacZ* mutant cells were grown in Gluc plus ammonium media supplemented with any of the different polyamines, no increases in the ALDH activity of crude extracts were observed (Table 2). This finding strongly supports that the increases in ALDH activity observed in the wild-type cells are indeed due to increases in *PaPauC* activity.

When 20 mM Put or 20 mM Cad were added to culture media containing 20 mM Gluc plus ammonium, the extent of growth of the *pauC::ISlacZ* cells was similar to that of the wild-type strain under the same conditions. However, growth was importantly reduced

when 0.5 mM Spm, 5 mM Spd, or 5 mM Dap were added to media containing 5 mM Gluc (Fig. 4A), indicating the critical role that *PaPauC* plays in preventing the toxicity of these polyamines by oxidizing a toxic aminoaldehyde formed in their degradation. As shown in Scheme 1, the degradative routes of the three toxic polyamines share the formation of APAL and GluAPAL – aldehydes not formed in the degradation of Put, which does not have a negative effect on cells growth even when added at a high concentration. Of these two aldehydes, APAL is most likely the toxic one, given its proven toxicity to other cells [30–32]. The nontoxicity of GluAPAL is consistent with the elimination of the toxicity of aminoaldehydes by chemical modification of the ω-amino group [32–33], either by glutamylation, as happens in *P. aeruginosa* and other bacteria [6,7,34,35], or by acetylation, as occurs in other prokaryotic and eukaryotic cells [33,36–38].

Table 2. Effect of polyamines on *PaPauC* activity measured in crude extracts from *P. aeruginosa* cells. Specific activities were determined at 30 °C, potassium phosphate buffer pH 8.0, 1 mM ABAL or 1 mM APAL and 0.6 mM NAD⁺. mU, nmol NADH formed/min. Cells were grown for 24 h in the indicated substrates and concentrations. Data are from two independent experiments. N.D., not determined. N.G., no growth.

Growth substrates	WT strain			<i>pauC::ISlacZ</i> strain		
	Culture growth (O. D. ₆₀₀)	Specific activity (mU·mg ⁻¹ prot)		Culture growth (O. D. ₆₀₀)	Specific activity (mU·mg ⁻¹ prot)	
		ABAL	APAL		ABAL	APAL
20 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	1.01 ± 0.05	25 ± 4	22 ± 5	1.02 ± 0.02	12.5 ± 0.7	7.8 ± 0.2
5 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.52 ± 0.02	16 ± 5	N.D.	0.52 ± 0.02	N.D.	N.D.
20 mM Put	0.79 ± 0.03	128 ± 12	56 ± 9	N.G.		
20 mM Put + 20 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.82 ± 0.04	88 ± 7	42 ± 6	0.79 ± 0.03	5.5 ± 3.5	1.8 ± 1.1
20 mM Cad	0.77 ± 0.06	98 ± 7	55 ± 4	N.G.		
20 mM Cad + 20 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.78 ± 0.02	38 ± 10	35 ± 1	0.80 ± 0.03	9.5 ± 3.5	N.D.
0.5 mM Spm	0.11 ± 0.01	77 ± 8	40 ± 11	N.G.		
0.5 mM Spm + 5 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.50 ± 0.04	60 ± 2	40 ± 4	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.14	0.1 ± 0.1
5 mM Spd	0.61 ± 0.03	184 ± 12	70 ± 13	N.G.		
5 mM Spd + 5 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.81 ± 0.07	71 ± 7	34 ± 12	0.13 ± 0.02	2.1 ± 0.2	3.2 ± 1.3
5 mM Dap	0.22 ± 0.05	67 ± 17	42 ± 8	N.G.		
5 mM Dap + 5 mM Gluc + 15 mM NH ₄ Cl	0.45 ± 0.10	65 ± 17	48 ± 4	0.08 ± 0.01	3.6 ± 0.2	N.D.

The toxicity of Spm, Spd, or Dap correlates with the levels of *PaPauC* activity

We further explored the toxicity of Spm and Spd to the wild-type *P. aeruginosa* cells by adding different concentrations of these polyamines to culture media containing 20 mM Gluc—a 4-times higher concentration than the one we used in the experiments described above and shown in Fig. 4A—in order to simulate the richer nutrient media that the bacteria may encounter in the infection sites. We found that 2.5 mM Spm was nontoxic to both the wild-type and *pauC::ISlacZ* cells (Fig. 4D) while we had observed that Spm at only 0.5 mM was highly toxic to these cells growing in a medium containing 5 mM Gluc (Fig. 4A). These results suggest that the high Gluc concentration produced a greater degree of catabolic repression of the genes involved in the polyamines degradative routes than that produced by 5 mM Gluc, thus importantly diminishing the formation of the toxic aldehyde intermediate, which, if formed at all, seems to be oxidized by the low ALDH activity present in the mutant cells. The same reasoning applies for the observed lack of toxicity of 2.5 mM Spd in both kinds of cells. However, as the polyamine concentration in the growth medium is raised, the catabolic repression will be partially relieved by the polyamine and consequently the extent of the polyamine degradation increased, so that the formation of the toxic aldehyde becomes greater. *PaPauC* activity will probably be higher than that at the lower polyamine concentrations, but still lower than that at the same polyamine concentrations in the presence of 5 mM Gluc. Therefore, if the toxic aldehyde formed is APAL, the low *PaPauC* activity together with the low catalytic efficiency of *PaPauC* toward APAL particularly in the presence of GluAPAL will lead to APAL accumulation up to toxic concentrations in wild-type cells. This explanation is consistent with the finding that 5 mM Spd was toxic to wild-type cells grown in 20 mM Gluc (Fig. 4D), while 5 mM Spd even promoted growth at 5 mM Gluc (Fig. 4A). At 20 mM Gluc, the *PaPauC* activity clearly is not sufficient to oxidize the APAL formed in the degradation of 5 mM Spd. Thus, a nutrient rich medium—here exemplified by a high Gluc concentration—would therefore protect against toxicity of low Spm or Spd concentrations, but would increase the susceptibility of the cells, particularly of those with an inhibited or absent *PaPauC* activity, to the toxicity of these polyamines, especially of Spd.

If the higher toxicity of Spm and Spd in the richer culture medium is due to catabolic repression of the *PapauC* gene (Fig. 4C) resulting in a lower *PaPauC*

activity (Fig. 4B), it would be expected that a non-toxic polyamine such as Put will reduce the toxic effects of these two polyamines in the wild type cells at the high Gluc concentration. Put is known to induce other genes involved in Spd degradation [6], and in this work we show that at 20 mM and in the presence of 20 mM Gluc produces a significant *PaPauC*-activity increase, although smaller than in the absence of Gluc (Fig. 4B and Table 2). Because of the induction of the polyamines degradation pathways by Put, more APAL will be produced in the degradation of Spm and Spd, but at the same time, the Put-induced increases in *PaPauC* activity will allow the oxidation of a greater proportion of the APAL formed, even considering the competition for *PaPauC* of ABAL and GluABAL produced from Put. On the contrary, the presence of Put will even increase the toxicity of Spm and Spd to the mutant cells— which will have increased levels of APAL and no *PaPauC* activity— thus widening the difference in sensitivity of both kinds of cells to the two latter polyamines. Indeed, this is what we observed (Fig. 4E). At 2.5 mM Spm or 2.5 mM Spd, growth inhibition was observed in the mutant cells in the presence of Put, while no inhibition was observed in its absence. At 5 mM Spm or 5 mM Spd, the inhibitory effect of these polyamines on the growth of wild-type cells was much less than that observed at the same concentrations, but in the absence of Put, which suggests that, as expected, the Put-triggered increases in *PaPauC* activity are partially counteracting the higher concentrations of APAL. However, still the toxic effects of 5 mM Spd were higher than those observed in the 5 mM Gluc medium, consistent with higher steady-state APAL levels. The concentrations of APAL formed under these conditions, i.e. high Gluc concentration, moderate Spm or Spd concentrations, and high Put concentration, completely inhibited of growth of the mutant cells. Therefore, inhibition of *PaPauC* will result in increased toxicity of Spm and Spd on *P. aeruginosa* cells even if the bacterium is growing in a nutrient-rich media and in the presence of Put—the most common and abundant polyamine in human tissues [8,10,17].

APAL, but not GluAPAL, is highly toxic to *P. aeruginosa* cells

To provide additional evidence supporting our hypothesis that the toxic effects of Spd, Spm, and Dap are importantly due to the toxic APAL formed in their degradation, we investigated whether wild-type *P. aeruginosa* cells could grow in APAL or GluAPAL. For

comparative purposes, we also tested as growth substrates ABAL and GluABAL formed in the degradation of Put. When each of these aminoaldehydes were used as the only carbon and nitrogen sources, the wild-type cells grew very well in the presence of 5 mM GluAPAL or 5 mM GluABAL, even better than in Gluc 5 mM, and less well in ABAL (Fig. 5A). Moreover, when the growth media containing 5 mM Gluc plus 15 mM NH₄Cl were supplemented with ABAL, GluAPAL, or GluABAL, none of them inhibited cells growth; even in the case of ABAL, the cells grew better than did in the absence of this aldehyde. These results indicate that all these three aldehydes not only can support growth of the cells but also that none of them is toxic at the concentrations used in these experiments – which probably are much higher than their steady-state concentrations during polyamines degradation. In contrast, the cells were not able to grow in 5 mM APAL even when Gluc plus ammonium as carbon and nitrogen sources were present (Fig. 5A), clearly showing the toxicity of APAL. A small toxic effect of APAL was even observed when 1 mM APAL was added to the 5 mM Gluc plus 15 mM NH₄ medium (results not shown). These findings strongly support our proposal that the toxic aldehyde produced in Spm, Spd, and Dap degradation is APAL and are consistent with both the toxicity of these three polyamines and the lack of toxicity of Put or Cad, which do not form this aldehyde during their degradation. Put is toxic at concentrations higher than the one used in our studies [36,39,40], but it is likely that at these high concentrations part of Put forms Spd [41], and, therefore, the

observed toxicity might be due to Spd degradation. Alternatively, or additionally, these high concentrations may produce a serious imbalance in polyamines metabolism.

Interestingly, although the cells grew in ABAL, GluABAL, or GluAPAL at 5 mM as the sole carbon and nitrogen sources, these aldehydes were not able to induce the expression of *PapauC* gene as assessed by the ALDH specific activity toward ABAL and APAL measured in the crude extracts of cells grown in these aldehydes, which was very low and similar to that measured in the cells grown in the 5 mM Gluc plus ammonium media (results not shown). Therefore, it appears that growth in these aldehydes as the only carbon and nitrogen sources can be achieved with a low basal *PaPauC* activity – or with the activity of another ALDH – probably because they are nontoxic or have a low-toxicity, so that they will not have any negative effect on growth even if their steady-state concentrations were high due to its presumably low oxidation rate.

Based on the results using the polyamines described above, to further explore the toxicity of APAL, we investigated its effects on wild-type and *pauC::ISlacZ* cells growing in 20 mM Gluc plus 15 mM NH₄Cl. For comparative purposes, we also studied the effects of GluAPAL, ABAL, and GluABAL. Also, in these experiments, the aldehydes were added after the culture had reached an optical density of 0.5 to find out the susceptibility to these aminoaldehydes of cells in the exponential phase of growth, not in the lag phase as in the experiments shown in Fig. 5A. Cell growth

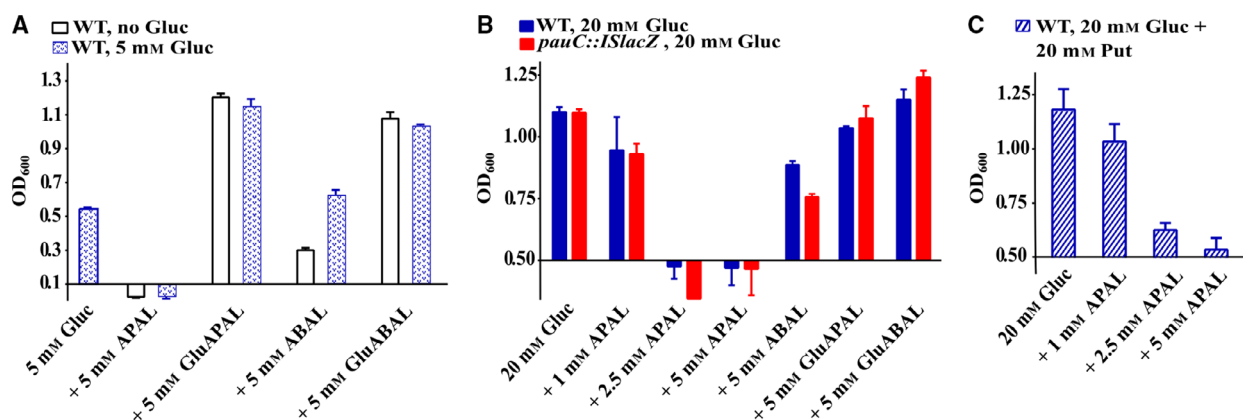


Fig. 5. Growth *P. aeruginosa* cells in free and glutamylated ω -aminoaldehydes and effects of these aldehydes on the growth in glucose. (A) Wild-type cells were grown for 24 h at 37 °C and 200 r.p.m. in the indicated aldehydes in the absence or presence of 5 mM glucose plus 15 mM NH₄Cl. (B) Effect of these aldehydes on the growth of wild-type and *pauC::ISlacZ* mutant cells in 20 mM Gluc plus 15 mM NH₄Cl. Aldehydes were added to the medium after it has reached 0.5 O. D. and then the cells were incubated for additional 16 h. (C) Effects of APAL on the growth of wild-type cells in 20 mM Gluc plus 15 mM NH₄Cl plus 20 mM Put and otherwise same conditions than in (B). Bars are the mean value of at least two different experimental determinations, and the vertical lines indicate the mean standard deviation.

was then measured after an additional 16 h incubation time. As shown in Fig. 5B, APAL at 1 mM produced similar growth inhibition in both kinds of cells, indicating that most of the ALDH activity toward APAL present in the wild-type cells is not due to *PaPauC* – which again appears to be importantly diminished at the high Gluc concentration – and that the other ALDH activity is not sufficient to completely oxidize APAL even at this low concentration. The presence of 2.5 mM or 5 mM APAL appears not only to totally arrest growth of the wild-type and mutant cells but also to exert a lethal effect, as suggested by the optical densities of the cultures at the end of the experiment, which were lower than when the aldehyde was added.

The finding that 5 mM ABAL produced some degree of growth inhibition in wild-type cells grown in 20 mM Gluc while no inhibition was observed when 5 mM ABAL was added to the 5 mM Gluc growth medium supports our previous conclusion that *PaPauC* activity is much lower in cells grown in Gluc 20 mM than in cells grown in Gluc 5 mM. Note that, different from polyamines, ABAL is not able to induce an increase in *PaPauC* activity, and therefore, in wild-type cells, this activity will be the same regardless of the presence or absence of ABAL in the growth medium. Understandable, ABAL inhibition of growth was higher in the mutant cells totally devoid of *PaPauC* activity. Still, ABAL toxicity was much lower than that of APAL at the same concentration, consistent with the known higher reactivity of APAL toward biological nucleophiles [30–32] and with the fact that APAL, but not ABAL, may spontaneously form the highly reactive acrolein [42]. Interestingly, the growth of both wild-type and mutant cells was not inhibited at all by 5 mM GluAPAL or 5 mM GluABAL (Fig. 5B), as we had observed in cells grown in 5 mM Gluc (Fig. 5A), indicating that glutamylation at the amino groups of these ω -aminoaldehydes greatly diminishes their toxicity – the same effect seen by the acetylation of polyamines in preventing toxicity [33] – and again supporting our proposal that this toxicity is mainly due to APAL formation during polyamines degradation.

Since the inhibitory effects of APAL, and in a lesser extent of ABAL, were higher in cells grown at a high Gluc concentration probably because of the catabolic repression of the *PapauC* gene, we reasoned that the presence in the culture media of Put, a polyamine that does not produce APAL in its degradation, will be of help in alleviating the toxic effects of APAL since the levels of *PaPauC* activity will be increased by this polyamine. Thus, we explored the effects that supplementing the Gluc plus ammonium media with Put 20 mM have on APAL toxicity. As expected, given our

results when Spm or Spd were added to the growth media in the presence of Put, the degree of growth inhibition by 1 mM APAL was significantly smaller than in the absence of Put. At APAL 2.5 mM and 5 mM, the wild-type cells still experienced some growth – although much less than the control cells to which APAL was not added, particularly at APAL 5 mM where growth was practically arrested – in contrast with the death of cells observed in the absence of Put (Fig. 5C). The decreased toxicity of APAL for the wild-type cells in the presence of Put when compared with that in the absence of the polyamine could be explained on the basis of the induction of the *PapauC* gene by Put leading to higher *PaPauC* activity. These results reinforce our conclusion that the degree of toxicity of Spm, Spd, Dap and APAL depends on the activity levels of *PaPauC* in cells.

Discussion

Formation of APAL is in great part responsible for Spm, Spd, and Dap toxicity to *P. aeruginosa* cells

The toxicity of Spm and Spd to a number of cells ranging from bacteria to mammals has been known for long and explained by different mechanisms (for a review, see [29]), which briefly may be encompassed in two: (a) binding to acidic sites of nucleic acids, membranes, or proteins and thus interfering with their functions, and/or replacing cations such as magnesium needed for these functions [43]; (b) generating in its catabolism a variety of potentially toxic compounds (aldehydes including acrolein, APAL, Spm-aldehyde, Spd-aldehyde, and reactive oxygen species) [30–32,44,45]. Even though these mechanisms may participate in Spm, Spd, or Dap toxicity to some extent, our findings in the study of these polyamines' impact on the growth of *P. aeruginosa* cells strongly indicate that one of the main factors underlying their toxicity is the formation of APAL during their degradation. Indeed, our results suggest that the toxicity of these polyamines can only be diminished when they produce very low concentrations of APAL, either because of their low concentrations in the culture media or because these polyamines degradation routes are highly repressed in a nutrient-rich medium.

That formation of APAL is responsible for the toxicity of these three polyamines is consistent with the toxicity of Spm being higher than that of Spd or Dap, given that according to their proposed degradative routes in *P. aeruginosa* (Scheme 1) Spm produces more APAL than Spd and Dap per molecule degraded. One

molecule of free-Spm could produce two APAL molecules, while only one APAL molecule per free-Spd or free-Dap molecule would be formed. The proportion of APAL formed from these polyamines may be less if they are glutamylated at some extent, because they will produce the glutamylated form of APAL (GluAPAL), which is nontoxic to *P. aeruginosa* cells as shown in this work. This proportion also depends on which of the primary amino group at the end of the Spd molecule is glutamylated, as shown in Scheme 1. However, in the case of Spm, free APAL is formed even from GluSpm. If it is assumed that APAL is formed at a much lower proportion than GluAPAL in Spd degradation as proposed [6], its much lower rate of oxidation by *PaPauC* than that of GluAPAL will favor higher steady-state concentrations of APAL than those of GluAPAL.

APAL toxicity has been explained by the formation of the highly reactive acrolein by spontaneous β -elimination [42], although it is not yet known the extent to which this reaction may occur in a cellular context. APAL may also be toxic on its own, because is a reactive aldehyde that can form covalent derivatives by binding to amino and sulfhydryl groups on proteins [31]. The proximity of the amino and aldehyde groups in this molecule might increase the electrophilicity of the APAL carbonyl carbon compared to that of aldehydes that lack the amino group, and this might explain that APAL has greater toxicity to cells than formaldehyde, acetaldehyde, and propionaldehyde [30]. Indeed, ABAL is also toxic [32], although much less than APAL, as shown in this work with *P. aeruginosa* cells. Unlike ABAL, which forms the non-reactive Δ^1 -pyrroline by cyclization, the shorter carbon chain of APAL cannot be cyclized. The nonenzymatic cyclization limits the reaction of ABAL with cellular components and therefore limits its potential toxic effects. Both the formation of acrolein from APAL and the increased reactivity of the APAL aldehyde group are abolished or diminished if the amino group forms an amide. Probably this is one of the main reasons why in prokaryotic and eukaryotic cells the primary amine group of polyamines are chemically modified – either by acetylation in the case of eukaryotic and some prokaryotic cells [36–38] or by glutamylation as in *P. aeruginosa* and other related bacteria [6,7,34,35] – previously to their degradation, thus preventing the formation of free ω -aminoaldehydes.

***PaPauC* is a novel potential drug target against *P. aeruginosa* infection**

The results presented here strongly support the importance of *PaPauC* in the toxicity of Spm, Spd and Dap

to *P. aeruginosa* cells. On the one hand, *PaPauC* plays a beneficial role in these cells. Its activity greatly contributes to diminish the toxicity of these polyamines by irreversibly oxidizing the toxic APAL produced in their degradation to the nontoxic beta-alanine, which *P. aeruginosa* cells can use as the only carbon and nitrogen source [46]. Our results indeed support that *PaPauC* is the main ALDH involved in APAL detoxification in *P. aeruginosa*. On the other hand, this beneficial role has a limitation because the low catalytic efficiency of *PaPauC* toward APAL compared to that toward the other aminoaldehydes produced in the degradation of Spd and Put—particularly toward GluAPAL—will result in an insufficient oxidation of APAL. In addition, although we have found increased *PaPauC* activity in crude extracts of *P. aeruginosa* cells incubated in media containing polyamines, we have also found that *PaPauC* activity may be very low – and therefore not sufficient to detoxify the APAL formed – in cells grown in media containing other carbon and nitrogen sources. Hence, although a low *PaPauC* activity *in vivo* appears to be sufficient to support growth in Put, it seems not to be sufficient to avoid the toxicity of Spm, Spd, or Dap, even at lower concentrations than Put, probably because of the low *PaPauC* capacity to oxidize the APAL formed in their degradation at an adequate rate to prevent its intracellular build-up. Thus, *PaPauC* would fail to fully protect *P. aeruginosa* cells against Spm, Spd, and Dap toxicity under physiological conditions unless the concentrations of these polyamines in the growth medium are very low. Precisely because of this, *PaPauC* emerges as a novel potential drug target that might be of help to combat this important pathogen. Its relatively low activity with APAL in the presence of competing physiological substrates increases its sensitivity to inhibition, which will greatly enhance the susceptibility of *P. aeruginosa* cells to Spm, Spd, or Dap toxicity, particularly under the conditions that probably take place in the infection sites, i.e. nutrient-rich media and the simultaneous presence of Spm, Spd, and Put.

Targeting polyamines catabolism by inhibiting glutamyl-polyamine synthetases has been proposed as a good new strategy to fight *P. aeruginosa* [24] and *Streptomyces coelicolor* [47] infections. Indeed, a mutant *P. aeruginosa* strain devoid of PauA2 – one of the six glutamyl-polyamine synthetases present in this bacterium – did not grow in the presence of Spm or Spd, although it grows in Dap, which is glutamylated by a different glutamyl-polyamine synthetase [6]. These results proved the importance of glutamylation to diminish the toxicity of these polyamines and are in agreement with the lack of toxicity of GluAPAL

reported here. Also, these results are consistent with our proposal that one of the main culprits of these polyamines toxicity is APAL, since in the absence of the glutamyl-polyamine synthetase activity, Spm and Spd will only be degraded as their free forms, leading to a higher production of APAL than when the glutamylation pathway operates. Consequently, these polyamines will exhibit increased toxicity in the mutant strain Δ *pauA2*. But since APAL will be oxidized by *PaPauC* much better in the absence of GluAPAL than in its presence, the intracellular levels of APAL in the Δ *PauA2* mutant might be lower than when *PaPauC* is absent. Therefore, in order to achieve APAL accumulation inside *P. aeruginosa* cells, and therefore to increase the toxicity of Spm, Spd, and even that of Dap, inhibition of *PaPauC* could be a more effective strategy than inhibition of *PauA2*. To prove this hypothesis, the toxicity of these polyamines should be measured in the two kinds of *P. aeruginosa* mutant cells under exactly the same experimental conditions. Inhibiting both enzymes, *PaPauC* and *PauA2*, could be even better than inhibiting only one of them. Particularly, *PaPauC* inhibition would increase the effects of *PauA2* inhibition since, as mentioned, the absence of GluAPAL, or lower levels of GluAPAL relative to APAL, would result in a more efficient oxidation of APAL by *PaPauC*. Thus, the effects of *PauA2* inhibition would be partially counteracted if *PaPauC* were not simultaneously inhibited.

The reported polyamines concentrations in different tissues and fluids of cystic fibrosis or cancer patients might be, however, too low to produce toxic concentrations of APAL in *P. aeruginosa* cells even if *PaPauC* is inhibited. Because of this, increasing the levels of these polyamines in the infection sites by dietary supplementation can be envisaged as a good and safe strategy to help in combating *P. aeruginosa* infection. Spd and Put have been proposed to mimic the beneficial effects of caloric restriction on longevity and wellbeing and have multiple others benefits to human health [48–54]. Indeed, Spd is currently promoted as a well-tolerated nutritional supplement for humans [55–57]. Spd supplementation may therefore be an adjuvant therapy to increase the efficacy of antibiotic treatments, as suggested by the increased susceptibility of *P. aeruginosa* cells to several antibiotics when Spd was added to the culture media [58], as was also found for Spm, Put, and Cad, the latter two at high concentrations [58,59]. The use of the Spm to fight infection by *Pseudomonas* species has even been reported in plants. Increasing Spm levels – either by genetic manipulation of its synthesis or by administrating the polyamine to the plant – increased the resistance of *Arabidopsis thaliana* to the pathogen *Pseudomonas viridiflava* [60].

Several drug targets have been proposed as a strategy to fight *P. aeruginosa* infections [61]. We now propose *PaPauC* as a new potential target to combat this important human pathogen because its inhibition has several advantages. (a) It would disrupt the catabolism of polyamines, which are essential compounds for the bacteria whose synthesis and degradation must be balanced. Indeed, the *PapauC* gene is considered to be part of the core genome of the genus *Pseudomonas* [62]. (b) It would cause the accumulation of toxic aldehydes, especially APAL. (c) It could be made specific since *PaPauC* belongs to the ALDH27 family exclusive of bacteria [63]. (d) The search and design of specific inhibitors would be facilitated since its 3D structure is known (PDB 6B4R). (e) It could be used as an adjuvant therapy to increase the susceptibility of *P. aeruginosa* to antibiotics. (7) It could increase the adverse effects that would have the dietary Spd supplementation to *P. aeruginosa* cells in infected patients.

The structural features of the *PaPauC* active site could be used to develop a specific inhibitor

The ALDHs involved in the catabolism of polyamines in animals belong to the ALDH9 family [64]. A structural comparison of the human enzyme (ALDH9A1; PDB code 6VR6, [65]) with *PaPauC* (PDB code 6B4R) shows structural differences in residues of the aldehyde-binding site of these enzymes (Fig. 6) that suggest that it might be feasible to specifically inhibit *PaPauC* without affecting ALDH9A1. While the catalytic residues, particularly the catalytic Cys, and two aromatic residues – Trp176 and Phe467 in *PaPauC*, Trp165 and Phe457 in ALDH9A1 – are conserved, Ile119, Ser123, Asp459, and Gly461 in *PaPauC* are changed to Leu108, Ile112, Gln449, and Ser451, respectively, in ALDH9A1. The negative charge of the side-chain of Asp459 in *PaPauC* could be used to increase the binding of a compound with a positive charge in its active site. And the changes in size and position of the other residues, together with a movement away from the active site in *PaPauC* of the loop to which Asp459 and Gly461 belong, result in an access to the aldehyde-binding subsite in *PaPauC* wider than in ALDH9A1, which could be exploited to use a bulky molecule as an inhibitor. A surface representation of the structures of the aldehyde-entrance tunnel in *PaPauC* and ALDH9A1 in Fig. 6A,B, respectively, show their different sizes. To further depict these differences, in Fig. 6C are shown the changes in the position of the loop and in the above-mentioned residues, represented as cartoon and sticks, respectively. We are currently studying the

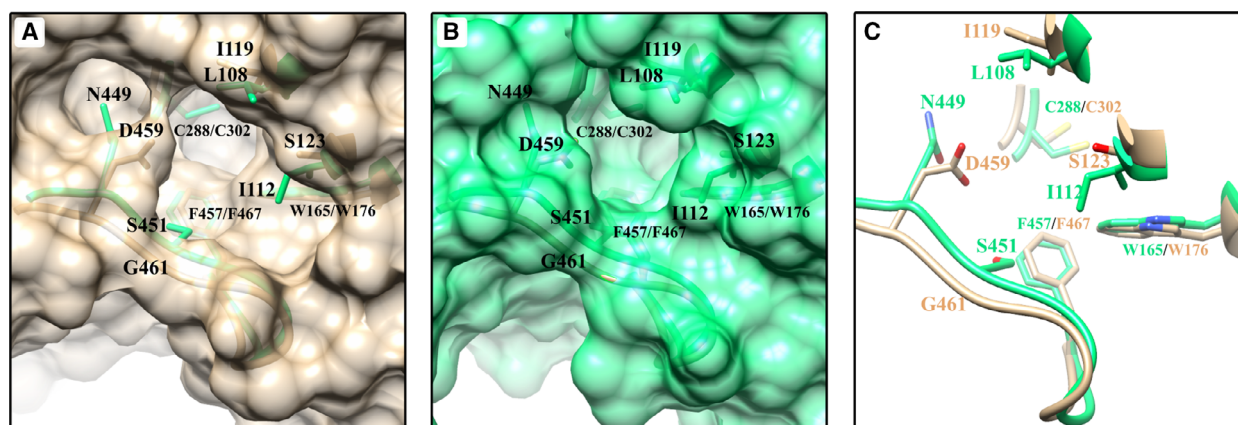


Fig. 6. Structural comparison of the active sites of *PaPauC* and ALDH9A1. (A and B) Surface representation showing the aldehyde-binding pockets of *PaPauC* (PDB: 6B4R; light brown carbons) and ALDH9A1 (PDB: 6VR6, green carbons). (C) Overlay of *PaPauC* and human ALDH9A1 backbones and sidechains of important amino acid residues in the aldehyde-binding site of *PaPauC* (light brown carbons) and ALDH9A1 enzymes (green carbons). Oxygen atoms are in red, nitrogen in blue, and sulfur in yellow. Mainchains are shown as ribbons, and the sidechains of relevant residues as sticks. The figure was generated using UCSF Chimera (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>).

structure–function relationships of *PaPauC* and ALDH9A1 in order to explore these structural features than might be useful for a rational selection or design of specific inhibitors of *PaPauC*.

Conclusion

Our results contribute to the understanding of the catabolism of Spm, Spd, and Dap in *P. aeruginosa* cells, shed light on the participation of APAL in the mechanism of toxicity of these three important polyamines, and provide evidence of the important role of *PaPauC* on diminishing this toxicity. Thus, *PaPauC* emerges as a novel potential drug target to counteract infection by this important pathogen. The much lower catalytic efficiency of *PaPauC* for APAL than for GluAPAL probably would lead to the accumulation of APAL up to toxic levels under physiological conditions, even if its complete inhibition is not achieved, especially if its inhibition is accompanied with a diet supplemented with Spd, which is actually considered to be an important human nutritional supplement. Moreover, inhibition of *PaPauC* plus the dietary administration of Spd may be an adjuvant therapy to increase the efficacy of antibiotic treatments.

Materials and methods

Chemicals and biochemicals

NAD⁺, β-mercaptoethanol, putrescine dihydrochloride, cadaverine dihydrochloride, 1,3-diaminopropane, spermine, spermidine, the diethyl acetal forms of ABAL and APAL,

N-(benzyloxycarbonyl)-L-glutamic acid, pivaloyl chloride, and silica gel were obtained from Sigma-Aldrich. All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers. The diethyl acetal forms of GluAPAL and GluABAL were synthesized by a novel procedure described below and depicted in Scheme 2. Free APAL, ABAL, GluAPAL, and GluABAL were freshly obtained by hydrolyzing the corresponding diethyl acetal forms in 0.2 N HCl at 60 °C for 15 min. The exact concentration of the resulting free aldehydes was determined in each experiment by measuring the amount of NADH produced after its complete oxidation in the reaction catalyzed by *PaPauC* in the presence of an excess of NAD⁺.

Chemical synthesis

Chemical reactions were monitored by analytical thin layer chromatography using TLC plates ALUGRAM® Xtra SIL G (Macherey Nagel) through visualizing the spotted plates under ultraviolet light at 254 nm. Intermediates products were purified by column chromatography using silicagel. Proton and carbon NMR as well as DEPTQ135, COSY, HMBC, and HSQC NMR were analyzed for final products on Bruker Model Avance III HD instrument with a two-channel BBFO SMART probe, using D₂O as solvent (500 MHz). Chemical shifts are reported in parts per million (δ, p.p.m.). Coupling constants (J) were expressed in Hertz (Hz). Melting points were measured with a Kruss Optronic M5000 apparatus.

Synthesis of 4-glutamyl-aminobutyraldehyde diethyl acetal

A suspension of N-(benzyloxycarbonyl)-L-glutamic acid (5.0 g) (compound 1) in acetic anhydride (15 mL) was

heated to 60 °C until a clear solution was obtained. This solution was magnetically stirred for 14 h at room temperature and heated for 30 min at 70 °C. The reaction mixture was vacuum concentrated to dryness at 70 °C to yield a colorless gum (4.6 g), which was dissolved in toluene (40 mL). Then, benzyl alcohol (1.94 mL) was added, and the solution was magnetically stirred for 48 h at room temperature. The mixture was then concentrated to dryness in vacuum and the residue purified by column chromatography (methyl-tertbutyl-ether (MTBE)/heptane 1 : 1), yielding a colorless gum of N-(benzyloxycarbonyl)-L-glutamic acid α -monobenzyl ester (compound 2), which solidified in the freezer. Then, N²-(benzyloxycarbonyl)-N⁵-(4,4-diethoxybutyl)-L-benzyl glutamate was prepared by dissolving compound 2 (1.3 g) in dichloromethane (DCM) (13 mL) under a nitrogen atmosphere. The mixture was cooled to 0 °C and triethylamine (1.5 mL) was added, followed by pivaloyl chloride (0.44 mL). The resulting mixture was kept with stirring at 0 °C during 40 min. Next, a solution of 4-aminobutyraldehyde (ABAL) diethyl acetal (0.71 mL) in dichloromethane (5 mL) was added. The reaction mixture was stirred at room temperature for 12 h. The mixture was washed three times with brine (10 mL), and then the organic phase was concentrated to dryness with anhydrous sodium sulfate. 4-glutamylaminobutyraldehyde diethyl acetal (compound 3) was prepared in a hydrogenation bottle by dissolving N²-(benzyloxycarbonyl)-N⁵-(4,4-diethoxybutyl)-L-benzyl glutamate (1.4 g) in methanol (25 mL) to which 5% palladium on carbon (1.4 g) was added. The mixture was stirred at 50 psi of hydrogen pressure for 6 hours and then filtered over celite. Finally, the filtrate was evaporated to dryness to obtain solid GluABAL diethyl acetal (0.7 g; 74%), which was recrystallized from ethanol to give 0.44 g (47%) of the final compound.

Synthesis of 3-glutamyl-aminopropionaldehyde diethyl acetal

3-Glutamyl-aminopropionaldehyde diethyl acetal (GluAPAL; compound 4) was prepared following the same procedure as that used for the synthesis of GluABAL diethyl acetal, starting with a solution of N-(benzyloxycarbonyl)-L-glutamic acid α -monobenzyl ester (compound 2) (2.5 g) to which a solution of 3-aminopropionaldehyde (APAL) diethyl acetal (1.3 mL) in dichloromethane (5 mL) was added. GluAPAL diethyl acetal (compound 4) was prepared in a hydrogenation bottle, by dissolving N²-(benzyloxycarbonyl)-N⁵-(4,4-diethoxybutyl)-L-benzyl glutamate (2.9 g) in methanol (70 mL) to which 5% palladium on carbon (0.15 g) was added. The mixture was stirred at 50 psi of hydrogen pressure for 6 h and then filtered over celite. Finally, the filtrate was evaporated to dryness to obtain solid GluAPAL diethyl acetal (1.59 g; 99%), which was recrystallized from ethanol to give 0.8 g (50%) of the final compound.

Bacterial strains and bacterial growth

The *P. aeruginosa* MPAO1 and the mutant PA5312-A09::ISlacZ/hah (here called *pauC*::ISlacZ) strains were obtained from the transposon mutant library of *P. aeruginosa* [66] of the Washington State University, WA, USA. Both strains were grown overnight at 37 °C and 200 r.p.m. in Luria-Bertani (LB) medium (wild-type cells) or in LB supplemented with 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ tetracycline (mutant cells). From these cultures, fresh LB media were inoculated, and the cells were allowed to grow for 6 h. Then, cells were harvested and washed twice with a modified M9 minimal medium (48 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 8.6 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, pH 7.2), which did not contain any carbon or nitrogen sources. An appropriate volume was taken from this suspension to inoculate at OD₆₀₀ 0.1 the modified M9 minimal medium containing the indicated concentration of glucose plus 15 mM NH₄Cl, and/or polyamines at the concentration stated in each experiment. Cells were grown for 24 h at 37 °C and 200 r.p.m.

Cloning of *PapauC* gene and validation of the ISlacZ/hah insertion

Specific *PapauC* primers (5'-GGAATTCATATGACCACCTGACCCGCG-3' and 5'-CCGCTCGAGTCAGAGCTTGATCCAGGTCG-3', forward and reverse, respectively) covering the entire structural gene were designed based on its sequence (ID: 877979) retrieved from the *P. aeruginosa* genomic database (<https://www.pseudomonas.com/>) to amplify it by PCR using *P. aeruginosa* gDNA as template. The gDNA was prepared as described by Ausubel *et al.* [67]. The PCR products were cloned into pET28b(+) vector and the resulting plasmid – *pET28b(+)-PapauC* – used to transform *E. coli* XL10-Gold cells (Stratagene). Positive clones were confirmed by DNA sequencing, and no mutations were found.

The ISlacZ/hah insertion in the *PapauC* (PA5312) gene was confirmed by PCR using the same forward and reverse primers described above and the ISlacZ forward primer (5'-GGTAACGCCAGGTTTTCC-3').

Determination of *PapauC* gene expression

Two independent sets of *P. aeruginosa* MPAO1 grown for 24 h with the indicated growth substrates and two of *pauC*::ISlacZ strain grown with 20 mM Gluc plus 15 mM NH₄Cl as substrates were harvested by centrifugation at 6000× *g* for 5 min at 4 °C and immediately resuspended with preheated (95 °C) Max Bacterial Enhancement Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then, after 5 min of incubation at 95 °C, manufacturer's instructions were followed until the phase separation step. An equal volume of 100% ethanol was added to the aqueous phase and RNA purification was carried out using the Direct-zol RNA

purification kit (Zymo) following manufacturer's instructions. Finally, an additional DNase treatment was carried out using the gDNA removal kit (Jena Bioscience, Jena, Germany). Quantification and integrity of isolated RNA was assessed by Biodrop μ Lite spectrophotometer and agarose electrophoresis, respectively. The lack of gDNA contamination in the RNA fractions was tested by PCR, where no amplifications were observed. RT-qPCR assays were performed using the SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qRT-PCR kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) in a StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) using 100 ng of RNA for each reaction and following manufacturer's instructions. Specific primers for *PapauC* gene were designed (5'-ACACC-CAGCAGATGAACAC-3' and 5'-GTAGGTGCCACCAG TTTCTT-3'). Relative *PapauC* expression was calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [68] using the 20 mM Gluc plus 15 mM NH_4Cl growth condition as reference and the 50S ribosomal protein transcript L21 (*rpIU*; PA4568) as the endogenous control. The primers used for *rpIU* were 5'-ACAAGG TCCGCATCATCAA-3' and 5'-GAATGCCGGTGATCTT GATTTTC-3'.

Recombinant *PaPauC* expression, purification and association state determination

The *pET28b(+)-PapauC* construct was used to transform the *E. coli* strain BL21 Rosetta (DE3) (pLysS) cells (Novagen, Madison, WI, USA). The expression of the cloned gene was driven by isopropyl thio- β -D-galactoside (IPTG) and the *PaPauC* recombinant protein obtained by sonication of the cells in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 50 mM KCl, 10% (v/v) glycerol and 10 mM β -mercaptoethanol. Purification was carried out by affinity chromatography using Protino Ni-(tris(carboxymethyl) ethylene diamine) resin (Macherey-Nagel). Bound protein was eluted by gravity flow with elution buffer (50 mM potassium phosphate pH 7.0, 50 mM KCl, 10% (v/v) glycerol, 150 mM imidazole, 10 mM β -mercaptoethanol). Subsequently the protein was desalted in the same buffer but without imidazole using a HiPrep 26/10 desalting column prepacked with Sephadex G-25 and coupled to ÄKTA™ PURE FPLC system (Cytiva). *PaPauC* purity was assessed by 10% SDS/PAGE after Laemmli [69]. Enzyme aliquots were stored at -70°C until use. The pure recombinant protein concentration was determined spectrophotometrically by absorbance at 280 nm, using the extinction coefficient of $69\,900\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ per subunit, as predicted from the amino acid sequence of the recombinant *PaPauC* by ExPASy ProtParam [70].

The subunit size of *PaPauC* was assessed by 10% SDS/PAGE after Laemmli [69] and the association state of the protein by size exclusion chromatography (SEC) in a Superdex 200 HR-10/30 column coupled to an ÄKTA PURE FPLC equipment (Cytiva). A protein concentration of $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ was used in the SEC experiment.

PaPauC activity assay

The enzyme activity was assayed spectrophotometrically by following NADH production at 340 nm ($\epsilon = 6.22\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) [71] at 30°C in 1.0 cm path-length cuvettes in a final volume of 0.5 mL of 100 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, containing 600 μM NAD^+ —which we estimated may be close to the *in vivo* NAD^+ concentration given that this is the intracellular concentration reported for *E. coli* cells [72]—and the stated concentrations of pure recombinant enzyme or crude cell extracts protein and of the aldehydes being assayed. The exact concentration of the aldehydes used was determined by end-point assays of the pure recombinant *PaPauC*, and the exact concentration of NAD^+ by its absorbance at 260 nm using a molar absorptivity of $18\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ [73]. All assays were initiated by addition of the enzyme. Initial steady-state rates were determined from the initial linear portions of reaction progress curves. For assaying *PaPauC* activity in crude cell extracts, cells were cultured for 24 h using the indicated growth substrates and harvested and extracted as described above. After centrifugation, the supernatants were kept at 4°C and used for ALDH activity assays within 1 day. Protein concentration in the crude extracts was determined by the Bradford method [74] using bovine serum albumin as standard.

In the saturation experiments of the enzyme by the aldehyde, the initial velocity data were fitted to the Michaelis-Menten equation (Eqn 1).

$$v = V_{\max} [S] / (K_m + [S]) \quad (1)$$

where v is the initial velocity, V_{\max} is the maximal velocity, $[S]$ is the concentration of the variable aldehyde, and K_m is the concentration of substrate at half-maximal velocity.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge the critical reading of this manuscript by Dr. Gloria Soberón-Chávez, UNAM, and Dr. Herminia Loza-Tavera, UNAM. This work was supported by UNAM-DGAPA-PAPIIT grant IN220317 and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) grants 283524 and 252123 to RAMC. YVCC is a recipient of a CONACYT doctoral scholarship.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

YVCC performed the experiments and helped with data analysis and general discussion; JAJD carried out the RT-qPCR assays. JCC helped providing most

useful advice and supervision for cloning the gene and transforming cells; CMJ performed some growth experiments; IR, MLO, and AAC synthesized the glutamylated aldehydes; RAMC conceived and designed the study, analyzed data, provided guidance, and wrote the paper. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Data accessibility

The data that supports the findings of this study are available in Figs 1 to 6, Tables 1 and 2, and the supplementary material of this article.

References

- Streeter K & Katouli M (2016) *Pseudomonas aeruginosa*: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. *Infect Epidemiol Med* **2**, 25–32.
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Eldere JV, Glupczynski Y, Laethem YV, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A *et al.* (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* **13**, 560–578.
- Driscoll JA, Brody SL & Kollef MH (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* **67**, 351–368.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J *et al.* (2018) Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* **18**, 318–327.
- Jann A, Matsumoto H & Haas D (1988) The fourth arginine catabolic pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* **134**, 1043–1053.
- Yao X, He W & Lu CD (2011) Functional characterization of seven gamma-glutamylpolyamine synthetase genes and the bauRABCD locus for polyamine and beta-alanine utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **193**, 3923–3930.
- Chou HT, Li JY, Peng YC & Lu CD (2013) Molecular characterization of PauR and its role in control of putrescine and cadaverine catabolism through the γ -glutamyl pathway in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **195**, 3906–3913.
- Teti D, Visalli M & McNair H (2002) Analysis of polyamines as markers of (patho)physiological conditions. *J Chromatogr B* **781**, 107–149.
- Ibarra AA, Wrobel K, Escobosa AR, Elguera JC, Garay-Sevilla ME & Wrobel K (2015) Determination of putrescine, cadaverine, spermidine and spermine in different chemical matrices by high performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-ITMS/MS). *J Chromatogr B* **1002**, 176–184.
- Maráková K, Piešťanský J, Zelinková Z & Mikuš P (2020) Simultaneous determination of twelve biogenic amines in human urine as potential biomarkers of inflammatory bowel diseases by capillary electrophoresis–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **186**, 113294.
- Cohen LF, Lundgren DW & Farrell PM (1976) Distribution of spermidine and spermine in blood from cystic fibrosis patients and control subjects. *Blood* **48**, 469–475.
- Rennert OM, Frias J & Shukla JB (1976) Polyamine metabolism in cystic fibrosis. *Tex Rep Biol Med* **34**, 187–197.
- Russell DH, Rosenblum MG, Beckerman RC, Durie BG, Taussig LM & Barnett DR (1979) Altered polyamine metabolism in cystic fibrosis. *Pediatr Res* **13**, 1137–1140.
- Bachrach U (2012) Polyamines and carcinogenesis. *Acta Fac Medicae Naissensis* **29**, 165–174.
- Nowotarski SL, Woster PM & Casero RA (2013) Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. *Expert Rev Mol Med* **15**, e3.
- Sangale A, Bhat V, Kelkar R & Biswas S (2021) Microbiology of ventilator-associated pneumonia in a tertiary care cancer hospital. *Indian J Crit Care Med* **25**, 421–428.
- Grasemann H, Shehnaaz D, Enomoto M, Leadley M, Belik J & Ratjen F (2012) L-ornithine derived polyamines in cystic fibrosis airways. *PLoS One* **7**, e46618.
- Lu CD, Itoh Y, Nakada Y & Jiang Y (2002) Functional analysis and regulation of the divergent spuABCDEF–spuI operons for polyamine uptake and utilization in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **184**, 3765–3773.
- Dasu VV, Nakada Y, Ohnishi-Kameyama M, Kimura K & Itoh Y (2006) Characterization and a role of *Pseudomonas aeruginosa* spermidine dehydrogenase in polyamine catabolism. *Microbiology* **152**, 2265–2272.
- Chou HT, Kwon DH, Hegazy M & Lu CD (2008) Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **190**, 1966–1975.
- Foster A, Barnes N, Speight R & Keane MA (2013) Genomic organisation, activity and distribution analysis of the microbial putrescine oxidase degradation pathway. *Syst Appl Microbiol* **36**, 457–466.
- Kusano T & Suzuki H (2015) Polyamines: a universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism, 1st edn. Springer Japan, Tokyo.

- 23 Kusano T, Berberich T, Tateda C & Takahashi Y (2008) Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* **228**, 367–381.
- 24 Yao X, Li C, Zhang J & Lu CD (2012) γ -Glutamyl spermine synthetase PauA2 as a potential target of antibiotic development against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 5309–5314.
- 25 Inagaki E, Ohshima N, Takahashi H, Kuroishi C, Yokoyama S & Tahirov T (2006) Crystal structure of *Thermus thermophilus* Δ 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. *J Mol Biol* **362**, 490–501.
- 26 Velasco-García R, Mújica-Jiménez C, Mendoza-Hernández G & Muñoz-Clares RA (1999) Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *P. aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 1292–1300.
- 27 Valenzuela-Soto EM, Velasco-García R, Mújica-Jiménez C, Li G-G & Muñoz-Clares RA (2003) Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidney and amaranth leaves. *Chem Biol Interact* **143–144**, 139–148.
- 28 González-Segura L, Rudiño-Piñera E, Muñoz-Clares RA & Horjales E (2009) The crystal structure of a ternary complex of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* provides new insight into the reaction mechanism and shows a novel binding mode of the 2'-phosphate of NADP⁺ and a novel cation binding site. *J Mol Biol* **385**, 542–557.
- 29 Pegg AE (2013) Toxicity of polyamines and their metabolic products. *Chem Res Toxicol* **26**, 1782–1800.
- 30 Sharmin S, Sakata K, Kashiwagi K, Ueda S, Iwasaki S, Shirahata A & Igarashi K (2001) Polyamine cytotoxicity in the presence of bovine serum amine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* **282**, 228–235.
- 31 Ivanova S, Batliwalla F, Mocco J, Kiss S, Huang J, Mack W, Coon A, Eaton JW, Al-Abed Y, Gregersen PK *et al.* (2002) Neuroprotection in cerebral ischemia by neutralization of 3-aminopropanal. *PNAS* **99**, 5579–5584.
- 32 Wood PL, Khan MA & Moskal JR (2007) The concept of “aldehyde load” in neurodegenerative mechanisms: Cytotoxicity of the polyamine degradation products hydrogen peroxide, acrolein, 3-aminopropanal, 3-acetamidopropanal and 4-aminobutanal in a retinal ganglion cell line. *Brain Res* **1145**, 150–156.
- 33 Kakegawa T, Guo Y, Chiba Y, Miyazaki T, Nakamura M, Hirose S, Canellakis ZN & Igarashi K (1991) Effect of acetylpolyamines on *in vitro* protein synthesis and on the growth of a polyamine-requiring mutant of *Escherichia coli*. *J Biochem* **109**, 627–631.
- 34 Kurihara S, Oda S, Kato K, Kim HG, Koyanagi T, Kumagai H & Suzuki H (2005) A novel putrescine utilization pathway involves γ -glutamylated intermediates of *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* **280**, 4602–4608.
- 35 Krysenko S, Okoniewski N, Kulik A, Matthews A, Grimpo J, Wohlleben W & Bera A (2017) Gamma-glutamylpolyamine synthetase GlnA3 is involved in the first step of polyamine degradation pathway in *Streptomyces coelicolor* M145. *Front Microbiol* **8**, 726.
- 36 Forouhar F, Lee IS, Vujcic J, Vujcic S, Shen J, Vorobiev SM, Xiao R, Acton TB, Montelione GT, Porter CW *et al.* (2005) Structural and functional evidence for *Bacillus subtilis* PaiA as a novel N¹-spermidine/spermine acetyltransferase. *J Biol Chem* **280**, 40328–40336.
- 37 Zhu YQ, Zhu DY, Yin L, Zhang Y, Vonnrhein C & Wang DC (2006) Crystal structure of human spermidine/spermine N¹-acetyltransferase (hSSAT): the first structure of a new sequence family of transferase homologous superfamily. *Proteins: Struct Funct. Bioinformatics* **63**, 1127–1131.
- 38 Li B, Maezato Y, Kim SH, Kurihara S, Liang J & Michael AJ (2019) Polyamine-independent growth and biofilm formation, and functional spermidine/spermine N-acetyltransferases in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol* **111**, 159–175.
- 39 del Rio B, Redruello B, Linares DM, Ladero V, Ruas-Madiedo P, Fernandez M, Martin MC & Alvarez MA (2019) The biogenic amines putrescine and cadaverine show *in vitro* cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci Rep* **9**, 120.
- 40 Wunderlichová L, Buňková L, Koutný M, Jančová P & Buňka F (2014) Formation, degradation, and detoxification of putrescine by foodborne bacteria: a review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* **13**, 1012–1030.
- 41 Tabor CW & Tabor H (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol Rev* **49**, 81–99.
- 42 Alarcon RA (1964) Isolation of acrolein from incubated mixtures of spermine with calf serum and its effect on mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* **106**, 240–242.
- 43 Morris DR, Davis R & Coffino P (1991) A new perspective on ornithine decarboxylase regulation: Prevention of polyamine toxicity is the overriding theme. *J Cell Biochem* **46**, 102–105.
- 44 Kimes BW & Morris DR (1971) Inhibition of nucleic acid and protein synthesis in *Escherichia coli* by oxidized polyamines and acrolein. *Biochim Biophys Acta* **228**, 235–244.
- 45 Pledge A, Huang Y, Hacker A, Zhang Z, Woster PM, Davidson NE & Casero RA (2005) Spermine oxidase SMO(PAOh1), not N¹-acetylpolyamine oxidase PAO, is the primary source of cytotoxic H₂O₂ in polyamine analogue-treated human breast cancer cell lines. *J Biol Chem* **280**, 39843–39851.
- 46 Chou HT, Li JY & Lu CD (2014) Functional Characterization of the agtABCD and agtSR operons for 4-aminobutyrate and 5-aminovalerate uptake and regulation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Curr Microbiol* **68**, 59–63.

- 47 Krysenko S, Matthews A, Busche T, Bera A & Wohlleben W (2021) Poly- and monoamine metabolism in *Streptomyces coelicolor*: the new role of glutamine synthetase-like enzymes in the survival under environmental stress. *Microb Physiol* **27**, 1–15.
- 48 Soda K (2015) Biological effects of polyamines on the prevention of aging-associated diseases and on lifespan extension. *Food Sci Technol Res* **21**, 145–157.
- 49 Tong D & Hill JA (2017) Spermidine promotes cardioprotective autophagy. *Circ Res* **120**, 1229–1231.
- 50 Tsikas D, Erik H & Gorig B (2017) Spermidine for a long, dementia-free life? *Glob J Pharmaceu Sci* **2**, 555576.
- 51 Madeo F, Eisenberg T, Pietrocola F & Kroemer G (2018) Spermidine in health and disease. *Science* **359**, eaan2788.
- 52 Madeo F, Bauera MA, Carmona-Gutierrez D & Kroemer G (2019) Spermidine: a physiological autophagy inducer acting as an anti-aging vitamin in humans? *Autophagy* **15**, 165–168.
- 53 Pietrocola F, Castoldi F, Kepp O, Carmona-Gutierrez D, Madeo F & Kroemer G (2019) Spermidine reduces cancer-related mortality in humans. *Autophagy* **15**, 362–365.
- 54 López-Otín C, Galluzzi L, Freije JMP, Madeo F & Kroemer G (2016) Metabolic control of longevity. *Cell* **166**, 802–821.
- 55 Kiechl S, Pechlaner R, Willeit P, Notdurfter M, Paulweber B, Willeit K, Werner P, Ruckstuhl C, Iglseder B, Weger S *et al.* (2018) Higher spermidine intake is linked to lower mortality: a prospective population-based study. *Am J Clin Nutr* **108**, 371–380.
- 56 Schwarz C, Stekovic S, Wirth M, Benson G, Royer P, Sigrist SJ, Pieber T, Dammbrueck C, Magnes C, Eisenberg T *et al.* (2018) Safety and tolerability of spermidine supplementation in mice and older adults with subjective cognitive decline. *Aging* **10**, 19–33.
- 57 Wirth M, Schwarz C, Benson G, Horn N, Buchert R, Lange C, Köbe T, Hetzer S, Maglione M, Michael E *et al.* (2019) Effects of spermidine supplementation on cognition and biomarkers in older adults with subjective cognitive decline (SmartAge)-study protocol for a randomized controlled trial. *Alzheimers Res Ther* **11**, 36.
- 58 Kwon DH & Lu CD (2006) Polyamines increase antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1623–1627.
- 59 Manuel J, Zhanel GG & de Kievit T (2010) Cadaverine suppresses persistence to carboxypenicillins in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 5173–5179.
- 60 Gonzalez ME, Marco F, Minguet EG, Carrasco-Sorli P, Blázquez MA, Carbonell J, Ruiz OA & Pieckenstein FL (2011) Perturbation of spermine synthase gene expression and transcript profiling provide new insights on the role of the tetraamine spermine in *Arabidopsis* defense against *Pseudomonas viridiflava*. *Plant Physiol* **156**, 2266–2277.
- 61 Sigurdsson G, Fleming RMT, Heinken A & Thiele I (2012) A systems biology approach to drug targets in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *PLoS One* **7**, e34337.
- 62 Riveros-Rosas H, Julián-Sánchez A, Moreno-Hagelsieb G & Muñoz-Clares RA (2019) Aldehyde dehydrogenase diversity in bacteria of the *Pseudomonas* genus. *Chem Biol Interact* **304**, 83–87.
- 63 Riveros-Rosas H, González-Segura L, Julián-Sánchez A, Díaz-Sánchez AG & Muñoz-Clares RA (2013) Structural determinants of substrate specificity in aldehyde dehydrogenases. *Chem Biol Interact* **202**, 51–61.
- 64 Vasiliou V & Nebert DW (2005) Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics* **2**, 138.
- 65 Wyatt JW, Korasick DA, Qureshi IA, Campbell AC, Gates KS & Tanner JJ (2020) Inhibition, crystal structures, and in-solution oligomeric structure of aldehyde dehydrogenase 9A1. *Arch Biochem Biophys* **691**, 108477.
- 66 Jacobs MA, Alwood A, Thaipisuttikul I, Spencer D, Haugen E, Ernst S, Will O, Kaul R, Raymond C, Levy R *et al.* (2003) Comprehensive transposon mutant library of *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* **100**, 14339–14344.
- 67 Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1997) Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology, 3rd edn. Wiley, NY.
- 68 Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-DDCT method. *Methods* **25**, 402–408.
- 69 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- 70 Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD & Bairoch A (2003) ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784–3788.
- 71 McComb RB, Bond LW, Burnett RW, Keech RC & Bowers GN (1976) Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clin Chem* **22**, 141–150.
- 72 Zhou Y, Wang L, Yang F, Lin X, Zhang S & Zhao ZK (2011) Determining the extremes of the cellular NAD(H) level by using an *Escherichia coli* NAD⁺-

auxotrophic mutant. *Appl Environ Microbiol* **77**, 6133–6140.

- 73 Dawson RM, Elliot DC, Elliot WH & Jones KM (1986) *Data for biochemical research*, 3rd edn. Clarendon Press, Oxford.
- 74 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1. NMR spectra of 4-glutamylaminobutyraldehyde (GluABAL) diethyl acetal.

Fig. S2. NMR spectra of 3-glutamylaminopropionaldehyde (GluAPAL) diethyl acetal.