

00381
50



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE BETAINA
ALDEHIDO DESHIDROGENASA DE
Pseudomonas aeruginosa"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

D O C T O R E N C I E N C I A S

(B I O L O G I A)

P R E S E N T A :

M. EN C. ROBERTO VELASCO GARCIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ROSARIO A. MUÑOZ CLARES

7-15777

MÉXICO, D.F.

2000.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Sinodales asignados para la revisión de esta tesis:

Presidente:	Dra. Gloria Soberón Chávez
Primer vocal:	Dr. Diego González Halphen
Segundo vocal:	Dra. Rosario A. Muñoz Clares
Tercer vocal:	Dr. Wilhelm Hansberg Torres
Secretario:	Dr. Jorge Vázquez Ramos
Suplente:	Dr. Rafael Moreno Sánchez
Suplente:	Dr. Gabriel Iturriaga de La fuente

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Osmorregulación en la Unidad de Morfología y Función, ENEP Iztacala, y en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Se recibió financiamiento del CONACYT (proyecto 2252P-N), del PAPIIT (proyecto IN210198) y del PADEP (proyectos 003356, 003362 y 003370).

A mi Padre†

A mi Madre

A Rocío

A nuestros dos murinos incansables:

Ruy y Fátima

A mis Hermanas y Hermanos

AGRADECIMIENTOS

A Rocío, por su paciencia y apoyo para que yo pudiera realizar este trabajo.

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, por enseñarme que cuanto más rigor se aplica en la actividad científica más satisfacción se puede encontrar en ella.

Al Dr. Sergio González Moreno, por haber confiado en mí y brindarme las facilidades para hacer investigación.

Al Biólogo Carlos Mújica Jiménez, quien siempre me brindó su ayuda y conocimientos sin escatimar tiempo y esfuerzo.

Al M. en C. Miguel Ángel Villalobos, por su excelente asesoría en la parte de biología molecular en este trabajo.

A Cesar, Heliot y Rebeca, por su amistad.

A Lilian, por su colaboración siempre empeñosa para entender a la enzima que aquí se estudia.

A todos los Sinodales que revisaron e hicieron sugerencias al trabajo. En especial al Dr. Jorge Vázquez Ramos y al Dr. Wilhelm Hansberg Torres, quienes además participaron cada semestre en los exámenes tutorales.

A nuestra Universidad Nacional Autónoma de México.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS.....	4
I. INTRODUCCIÓN.....	5
II. ANTECEDENTES.....	7
II.1. El proceso de osmorregulación en las bacterias.....	7
II.2. La bacteria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
II.3. Las enzimas aldehído deshidrogenasas.....	16
II.4. La enzima betaina aldehído deshidrogenasa.....	19
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVOS.....	22
IV.1. Objetivo general.....	22
IV.2. Objetivos particulares.....	22
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
V.1. Clonación del gen <i>badh</i> y sobreexpresión de la BADH en <i>E. Coli</i>	24
V.1.1. Diseño de oligonucleótidos.....	24
V.1.2. Aislamiento del DNA genómico de <i>P. aeruginosa</i>	24
V.1.3. Amplificación por PCR y clonación del gen de la BADH.....	25
V.1.4. Transformación de <i>E. Coli</i> e inducción de la síntesis de la BADH.....	26
V.1.5. Análisis por electroforesis e inmunorréplicas.....	27
V.1.6. Obtención de extractos y medición de la actividad de la BADH.....	27
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
VI.1. Artículo I. "Rapid Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ".....	29
VI.2. Artículo II. "Steady-State Kinetic Mechanism of NADP ⁺ - and NAD ⁺ - Dependent Reactions Catalysed by Betaine Aldehyde Dehydrogenase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ".....	39
VI.3. Purificación de la enzima BADH.....	81
VI.4. Propiedades fisicoquímicas de la BADH.....	82
VI.5. Propiedades cinéticas y relevancia metabólica de la BADH.....	94
VI.6. Clonación del gen de BADH y sobreexpresión de la enzima.....	101
VII. CONCLUSIONES.....	105
VIII. PERSPECTIVAS.....	107
IX. REFERENCIAS.....	109
APÉNDICE I.....	125
Suplemento del Artículo II: "Patrones de velocidad inicial y de inhibición de las reacciones de BADH dependientes de NAD ⁺ y NADP ⁺ "	

RESUMEN

El objetivo central del presente trabajo fue caracterizar fisicoquímica y cinéticamente la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) de *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que se comenzó por buscar una forma rápida para purificarla hasta homogeneidad. El protocolo experimental empleado involucra sólo dos pasos cromatográficos, obteniéndose un mayor rendimiento que el publicado por otros autores. Los resultados de los estudios en donde se utilizó centrifugación analítica, filtración en gel, entrecruzamiento químico y electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, sugieren que la enzima es un homodímero cuya subunidad pesa 61 kDa. Se produjo un anticuerpo convencional, policlonal, específico contra esta enzima. Se determinó su composición de aminoácidos y la secuencia de los primeros 21 residuos del extremo amino terminal. El estudio del efecto del pH sobre la actividad de BADH de *P. aeruginosa* mostró un intervalo de pH óptimo de 8.0-8.5 y la existencia de dos grupos ionizables, involucrados en la catálisis, con valores de pK de 7.0 y 9.7. La reacción de oxidación presentó una energía de activación de 39.8 kJ mol⁻¹. A diferencia de otras BADHs estudiadas hasta ahora, la enzima de *P. aeruginosa* no pudo utilizar como sustrato a otros aldehídos cargados positivamente. Aún cuando utiliza tanto NAD⁺ como NADP⁺, muestra preferencia por esta última coenzima.

La enzima se inactiva parcial y reversiblemente a 40 °C. La inactivación por dilución de la proteína se presentó a pH 8.0 y fue estable, aún a muy bajas concentraciones, a pH 6.5. La actividad de BADH de *P. aeruginosa* se perdió rápidamente en ausencia de K⁺. Todos los procesos de inactivación fueron bifásicos y únicamente la inactivación por dilución dependió de la concentración de enzima. El NADP⁺ protegió considerablemente a la enzima contra las condiciones de inactivación probadas.

Con relación a las propiedades cinéticas de la BADH de *P. aeruginosa* se ha encontrado que su mecanismo cinético, tanto en la reacción dependiente de NAD⁺ como de NADP⁺, es Bi-Bi al azar en estado estacionario, con una preferencia, particularmente en la reacción dependiente de NADP⁺, por la ruta en donde el NAD(P)⁺ es el primer sustrato y el NAD(P)H el último producto. A altas concentraciones de los dinucleótidos se forman los complejos no productivos E.NAD(P)⁺₂, E.NAD(P)H₂ y E.NADP⁺.NADPH.

La alta eficiencia catalítica que poseen la BADH y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *P. aeruginosa* ($k_{cat}/K_m^{NADP^+} = 1.6 \times 10^6$ y $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectivamente), la utilización dual de coenzimas que tienen con preferencia por el NADP^+ , su parecida afinidad por sus respectivos sustratos y la gran similitud en la posición que ocupan en sus vías metabólicas, sugieren que la BADH podría, además de participar en la adaptación hacia el estrés osmótico, jugar un papel anfibólico similar al que se ha propuesto para la G6PDH: produciendo NADH o NADPH, según las necesidades metabólicas de la bacteria.

ABSTRACT

The main goal of the present work was to characterise physicochemically and kinetically the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8) of *Pseudomonas aeruginosa*. A rapid and efficient purification protocol was developed. This protocol involves only two chromatographic steps, with greater yield than other published protocols. Analytical ultracentrifugation, gel filtration, chemical cross-linking and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis suggest that the enzyme is a homodimer with 61 kDa subunits. Its amino acid composition and the sequence of the first 21 residues of the amino terminal were determined. The study of the effect of pH on the activity of *P. aeruginosa* BADH showed an optimal pH range of 8.0-8.5 and the existence of two ionizable groups, involved in catalysis, with pK values of 7.0 and 9.7. The energy of activation of the oxidation reaction is 39.8 kJ mol⁻¹. Different from other BADHs, the enzyme of *P. aeruginosa* did not use positively charged aldehydes as substrate, other than betaine aldehyde. Even though it can use NAD⁺ or NADP⁺, it shows preference for the latter coenzyme.

The enzyme was partially and reversibly inactivated at 40 °C. Inactivation by dilution was observed at pH 8.0, but the enzyme was stable at pH 6.5, even at very low concentrations. The activity of BADH of *P. aeruginosa* was quickly lost in the absence of K⁺. All inactivations process were biphasic, and only inactivation by dilution depends on the enzyme concentration. NADP⁺ considerably protected the enzyme against these inactivating conditions.

Regarding to the kinetic properties of the *P. aeruginosa* BADH, the initial velocity patterns obtained using NAD(P)⁺, and the product and dead-end inhibition patterns, established that both mechanisms are steady-state random, with a preference, particularly in the NADP⁺-dependent reaction, for the route where NAD(P)⁺ binds first and NAD(P)H leaves last. High concentrations of the dinucleotides form the non-productive complexes E.NAD(P)⁺₂, E.NAD(P)H₂ and E.NADP⁺.NADPH.

On the basis of similarities in catalytic efficiency, mechanism kinetic, dual coenzyme specificity, affinity for the substrate, and location in the catabolic pathways of glucose or choline, we suggest that BADH and glucose-6-phosphate dehydrogenase fulfill a similar amphibolic role supplying the bacteria with NADH or NADPH as required.

ABREVIATURAS

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Adenosina 5´-trifosfato
BA	Betaína aldehído
BADH o BetB	Betaína aldehído deshidrogenasa
bp	Pares de bases
CDH o BetA	Colina deshidrogenasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario al RNA mensajero
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
ChE	Acetilcolinesterasa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GB	Glicinabetaína
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil β -D-Tiogalactopiranósido
LB	Medio de cultivo de Luria-Bertani
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamina-adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamina-adenina (forma reducida)
NADP⁺	Dinucleótido de nicotinamina-adenina fosfato (forma oxidada)
NADPH	Dinucleótido de nicotinamina-adenina fosfato (forma reducida)
NAGGN	N α -acetilglutaminilglutamina amida
PcPase	Fosfatasa de fosforilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PLC	Fosfolipasa C.
RNA_m	Ácido ribonucleico mensajero
SDS	Dodecil sulfato de sodio
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonias bacterianas

I. INTRODUCCION

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* es uno de los patógenos oportunistas más comunes en pacientes inmunodeprimidos. Posee una gran capacidad para crecer en diversas fuentes carbono, utilizando preferentemente intermediarios del ciclo de Krebs (como citrato o succinato). *P. aeruginosa* también puede crecer adecuadamente en glucosa; sin embargo, a diferencia de otras bacterias como *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* no metaboliza glucosa a través de la glucólisis debido a que no posee la enzima fosfofructocinasa. En este microorganismo el catabolismo de la glucosa involucra a la vía de Entner-Doudoroff. Las enzimas de esta ruta y los sistemas transportadores de glucosa son inducidos cuando *P. aeruginosa* crece en un medio con glucosa, mientras que la presencia de algunos intermediarios del ciclo de Krebs reprime la expresión de estas proteínas.

Otro de los muchos compuestos que *P. aeruginosa* puede utilizar como fuente de carbono es la colina. Este compuesto y sus precursores (fosfatidilcolina, fosforilcolina y acetilcolina) están presentes en los tejidos que infecta la bacteria, como las vías respiratorias y urinarias, los ojos y la piel quemada. Uno de los productos de la degradación de la colina es la glicinabetaína (GB). La GB funciona como un excelente osmoprotector en diversos organismos. En forma similar a lo señalado para glucosa, las enzimas de la ruta de colina y su transportador se inducen cuando este compuesto está presente en el medio, mientras que su transportador se reprime cuando *P. aeruginosa* crece en presencia de succinato.

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), que participa directamente en la síntesis de GB, parece tener un papel clave en el metabolismo de colina, no sólo al participar en la adaptación de la bacteria a un estrés osmótico, sino también al actuar sobre su sustrato, la betaína aldehído, un compuesto tóxico. Con relación a esto, recientemente se demostró que una mutante de *P. aeruginosa* sin BADH no crece en un medio con colina o con colina y GB. Este resultado parece estar dado por el efecto tóxico de la betaína aldehído que se acumula en la mutante. Lo anterior sugiere que la BADH puede ser un blanco adecuado para la acción de algunos inhibidores de esta enzima como agentes antimicrobianos.

Considerando que el diseño de inhibidores específicos para la BADH requiere de un mayor conocimiento de sus propiedades fisicoquímicas y cinéticas, el presente trabajo se encaminó a profundizar en estos aspectos de la enzima. Para ello fue necesario desarrollar inicialmente un método para purificar la BADH a homogeneidad. Se estudiaron diversas características fisicoquímicas y cinéticas de la BADH de *P. aeruginosa* y se determinó el mecanismo cinético de esta enzima en sus reacciones dependientes de NAD^+ y NADP^+ . También se logró clonar su gen y sobreexpresarla en *E. coli*.

II. ANTECEDENTES

II.1. El proceso de osmorregulación en las bacterias

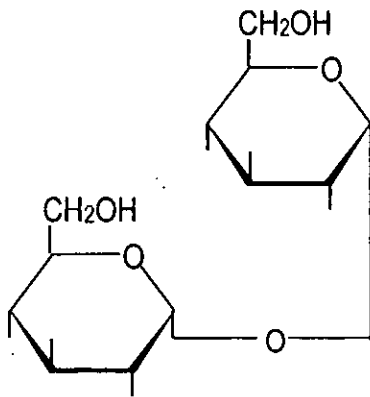
Debido a que las membranas biológicas son permeables al agua pero relativamente impermeables a muchos solutos, las células vivas son afectadas por los cambios en la osmolaridad del ambiente. Una disminución en la osmolaridad externa puede causar el hinchamiento y estallido de la célula, mientras que su incremento puede llevar a la plasmólisis y a la deshidratación celular. Uno de los procesos que son afectados por estos cambios es el de la división celular, ya que para que ésta se lleve a cabo se requiere una turgencia positiva desde el interior de las células como fuerza motriz de la expansión. En el caso de las bacterias Gram-negativas se ha estimado que la turgencia va de 3 a 10 X10⁵ Pa (3 a 10 bar), en tanto que en las Gram-positivas el valor es de 20 X 10⁵ Pa (20 bar) (Whatmore y Reed, 1990; Csonka y Epstein, 1996). Esta turgencia, y por ende también el volumen celular, se mantiene dentro de los límites compatibles para la fisiología celular gracias a los procesos de osmoadaptación u osmorregulación (Record *et al.*, 1998 a y b). Antes de referirnos a las estrategias de osmorregulación que utilizan las bacterias, debemos considerar que los microorganismos no poseen mecanismos de transporte activo para el agua, por lo que la turgencia es ajustada controlando los niveles citoplásmicos de solutos osmóticamente activos. Los dos esquemas básicos de osmorregulación descritos para las bacterias (Galinski y Truper, 1993) son: a) el mantenimiento del equilibrio osmótico por medio de la acumulación citoplásmica de una sal (principalmente KCl) hasta una concentración similar a la del medio. Esta estrategia, que es típica de las halobacterias y las arqueobacterias halófilicas, requiere de cambios fisiológicos que protejan las funciones metabólicas y reguladoras ante la salinidad (por ejemplo, los componentes celulares y enzimas deben estar adaptados a la sal). b) El segundo tipo de osmoadaptación involucra la acumulación intracelular (a través de la síntesis o captación desde el medio) de osmolitos orgánicos, también llamados solutos compatibles. Como su nombre lo indica, estos compuestos son compatibles con las funciones celulares y no interfieren con el metabolismo. Dicha definición de osmolito, sin embargo, únicamente toma en cuenta la función osmótica, pero no refleja la capacidad de estos compuestos como estabilizadores de las enzimas. Se ha

demostrado que algunos osmolitos también protegen a las enzimas de la salinidad, el calor, la deshidratación y el congelamiento (Brown, 1976; Pollard y Wyn Jones, 1979; Lippert y Galinski, 1992). Esta segunda estrategia, en comparación con la que involucra una acumulación de la sal, confiere una mayor flexibilidad adaptativa en un intervalo de salinidad amplio, y no requiere de una adaptación de la maquinaria enzimática.

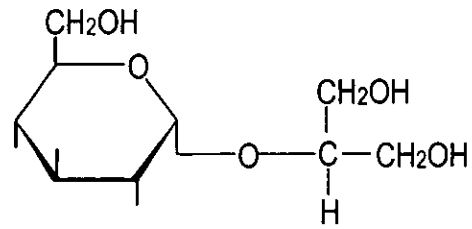
La acumulación de osmolitos no se restringe a los procariotes, ya que las plantas y los animales también utilizan esta respuesta adaptativa (Rhodes y Hanson, 1993; Petronini *et al.*, 1992). Además, la naturaleza de estos compuestos se conserva en los organismos de diferentes reinos, lo que refleja la importancia de estos osmolitos para las funciones celulares.

Los grupos de compuestos a los que pertenecen los osmolitos que se acumulan en los microorganismos se enuncian a continuación y se mencionan para cada uno de ellos las sustancias más representativas (ver también Figura 1): azúcares (trehalosa y sacarosa), azúcares alcoholes (glicerol y glicosilglicerol), aminoácidos libres (glutamato y prolina), aminas cuaternarias y sus análogos (glicinabetaina, carnitina y dimetilsulfoniopropionato), ésteres de sulfato (colina-*o*-sulfato) y péptidos pequeños y diaminoácidos N-acetilados (N-acetilglutaminilglutamina amida y N δ -acetil ornitina). En general, los solutos compatibles son moléculas polares altamente solubles que no presentan carga neta a pH fisiológico (Galinski *et al.*, 1993).

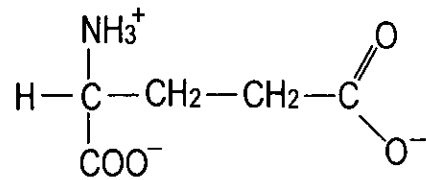
A la fecha no se conoce plenamente cómo estos osmolitos estabilizan y protegen las proteínas y otros componentes celulares de los efectos desnaturalizantes causados por una fuerza iónica elevada. Sin embargo, sus efectos osmoprotectores pueden ser interpretados en términos de compatibilidad con la estructura y función de las macromoléculas: mientras que los solutos "perturbadores" (iones inorgánicos) interactúan directamente con la superficie de la proteína, favoreciendo el desdoblamiento y la desnaturalización, los solutos compatibles son excluidos de la superficie proteica y de su esfera de hidratación inmediata, causando una disminución en la entropía del sistema (mayor orden), con lo que se estabiliza la conformación proteica y/o se promueve la asociación de las subunidades (modelo de exclusión preferencial) (Yancey *et al.*, 1982).



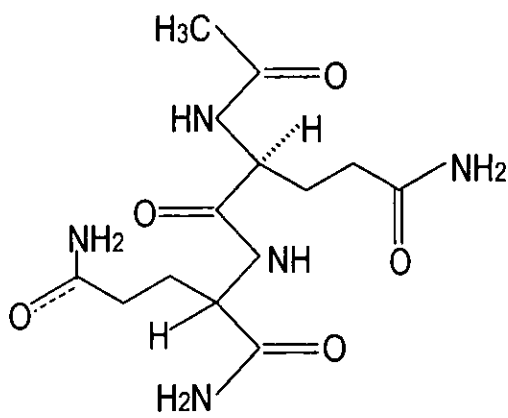
Trehalosa



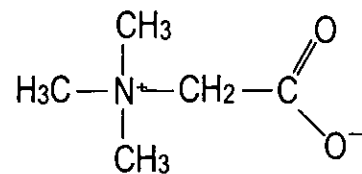
Glicosilglicerol



Ácido glutámico



N α -acetilglutaminilglutamina amida (NAGGN)



Glicinbetaína (GB)

Figura 1. Solutos compatibles representativos

El tipo y número de osmolitos que puede utilizar un microorganismo varía de acuerdo a la especie, la fase de crecimiento y el medio de cultivo utilizado. Así, mientras *Escherichia coli* sólo acumula glutamato y trehalosa cuando se le hace crecer en condiciones de estrés osmótico (Larsen *et al.*, 1987), *Pseudomonas aeruginosa* acumula, además de estos dos compuestos y como principal osmolito, el dipéptido NAGGN (D'Souza, 1993). Por otro lado, se sabe que dos cepas silvestres de *Sinorhizobium meliloti* acumulan GB durante la fase inicial y parte de la fase exponencial de crecimiento; después, durante la segunda mitad de la fase exponencial los niveles de este compuesto disminuyen y los del glutamato y NAGGN se incrementan, hasta que ambos solutos sustituyen casi por completo a la GB en cultivos envejecidos. La GB desaparece cuando las células estresadas llegan a la fase estacionaria y acumulan trehalosa como osmolito endógeno (Talibart *et al.*, 1997).

En *E. coli*, la secuencia de eventos que siguen a la adición de 0.5 M de NaCl al medio es la siguiente: inmediatamente después del choque osmótico las células toman grandes cantidades de K^+ a través de dos sistemas de captación independientes, uno de alta afinidad, Kdp, y otro de baja afinidad, TrK. La acumulación de K^+ es sobretodo debida al sistema Kdp, ya que el sistema TrK no es lo suficientemente activo para mantener por si solo la turgencia; la expresión del operón *Kdp* es inducida específicamente bajo condiciones de estrés osmótico (Laimins *et al.*, 1981).

Después de 1 minuto de haber dado el shock osmótico se incrementa la síntesis de glutamato, que contrarresta el aumento en cargas positivas y mantiene un nivel basal de K^+ libre (Dinnbier *et al.*, 1988). La síntesis de glutamato depende de la captación previa del K^+ . En un estudio *in vitro* (Measures, 1975) se demostró que la glutamato deshidrogenasa, una de las enzimas clave en la síntesis del glutamato, incrementa su actividad en un orden de 10 veces, cuando la concentración de K^+ en el medio de reacción es de 500 mM. Se ha propuesto que el par K^+ /glutamato acumulado puede servir como un segundo mensajero que dispara y coordina las respuestas osmóticas subsecuentes (Epstein, 1986; Higgins *et al.*, 1987). Utilizando un sistema de traducción *in vitro* de *E. coli*, el glutamato de potasio y en menor grado el acetato de potasio (mas no las sales de sodio) estimularon la expresión de ProU, un sistema transportador con alta afinidad para GB (Ramírez *et al.*, 1989).

Después de 30 minutos de iniciado el estrés las células comienzan a sintetizar trehalosa, y a las 2 horas este carbohidrato ha reemplazado prácticamente a todos los demás osmoprotectores (Dinnbier *et al.*, 1988), obteniendo un nivel moderado de tolerancia osmótica. Se ha demostrado en *E. coli* que el glutamato de potasio, en una concentración de hasta 600 mM en el medio de ensayo, activa *in vitro* a la trehalosa-6-fosfato sintetasa para acumular más trehalosa (Giaeever *et al.*, 1988).

Además de los solutos compatibles acumulados por la síntesis endógena, como el glutamato y la trehalosa, las arqueobacterias y las eubacterias tienen sistemas para poder transportar otros osmoprotectores, o sus precursores, del medio. La GB y la prolina frecuentemente se incorporan de esta forma y casi todos los microorganismos estudiados el nivel de tolerancia hacia el estrés osmótico aumenta cuando estos dos compuestos reemplazan a los osmolitos endógenos (Dinnbier *et al.*, 1988; D'souza *et al.*, 1993). La GB y la prolina son liberadas en los ecosistemas por bacterias productoras primarias, como *Actinopolyspora halophila*, un productor de GB (Severin *et al.*, 1992), por células animales y vegetales en descomposición, o por mamíferos, a través de sus productos de excreción. Los sistemas ProU y ProP de *E. Coli* transportan GB y prolina, así como a una amplia gama de osmoprotectores (ver Kemp y Bremer, 1998). La afinidad de estos transportadores es mayor para GB y prolinabetaína, en comparación con la que presentan por el iminoácido, para el que inicialmente fueron identificados como transportadores (Csonka y Epstein, 1996). La expresión génica y la actividad de estos sistemas son estimuladas osmóticamente (Kemp y Bremer, 1998).

Las bacterias como *E. coli* no sólo acumulan GB por un transporte directo, ya que pueden oxidar la colina a GB, teniendo como intermediario a la betaína aldehído (Landfald y Strom, 1986) (Ver Figura 2). Esta vía de síntesis está ampliamente distribuida en la naturaleza, tanto en procariotos como en eucariotos (Galinski y Truper, 1994; Rhodes y Hanson, 1993), existiendo algunas diferencias en los sistemas enzimáticos que se emplean para la síntesis de GB. Para oxidar la colina a betaína aldehído, *E. coli* utiliza una colina deshidrogenasa (CDH o BetA) que posee FAD como grupo prostético y que está unida a la membrana plasmática. La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH o BetB), que es citoplásmica, convierte específicamente la betaína aldehído a GB (Fig. 2). El transporte del precursor, la colina, ocurre a través de dos sistemas con diferente afinidad por este compuesto: el transportador BetT (con una

K_m de 8 μM) y el ProU, que trabaja concentraciones altas del sustrato ($K_m=1.5 \text{ mM}$) (Lamarck *et al.*, 1992; Styrvold, *et al.*, 1986).

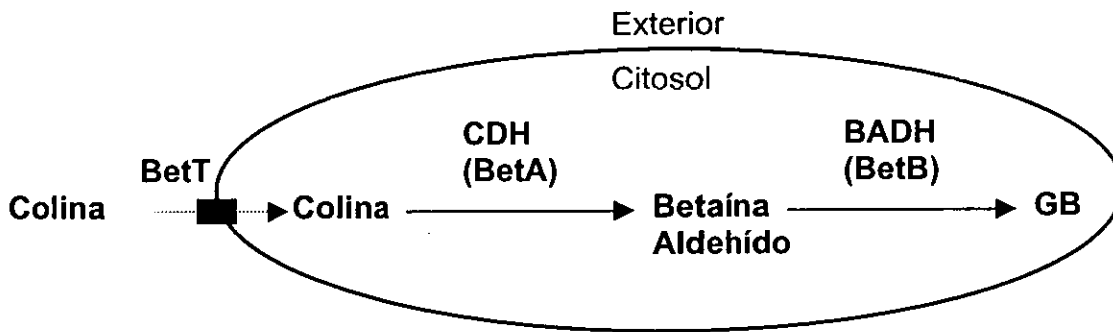


Figura 2. Síntesis de GB a partir de colina.

Se ha reportado que en *E. coli* la degradación de la colina se regula por presión osmótica. La expresión de las enzimas CDH y BADH (Landfald y Strom, 1986) y la del transportador de colina (Styrvold *et al.*, 1986) se inducen por este tipo de estrés. La expresión de las enzimas CDH y BADH es aún mayor cuando además se agrega colina al medio (Landfald y Strom, 1986). En dos estudios recientes usando *E. coli* (Eshoo, 1988; Lamarck *et al.*, 1996), se ha demostrado que además de los cambios en la osmolaridad y en el contenido de colina en el medio, la temperatura y el contenido de oxígeno estimulan el sistema *Bet*. La secuenciación del operón *bet* ha revelado que además de estar constituido por los genes estructurales *betT*, *betA* y *betB*, el sistema *bet* posee una región que codifica para una proteína reguladora llamada *BetI* (Lamarck *et al.*, 1991). *BetI* se une a la región que existe entre el gen *betT* y el operón *betIBA* y es responsable de la regulación transcripcional del regulón *bet*, dependiente de colina (Roekenes *et al.*, 1996). El control por oxígeno se ejerce mediante el sistema de dos componentes *ArcA-ArcB*, que es un par sensor-regulador que controla varios genes regulados por oxígeno en *E. coli* (Lamarck *et al.*, 1996).

La GB no es metabolizada en *E. coli*. Se ha visto que la bacteria no sobrevive cuando este compuesto es la única fuente de carbono en el medio (Perroud y Le Rudulier, 1985). En cambio, *Sinorhizobium meliloti*, otra especie que también acumula GB durante un estrés osmótico, tiene la capacidad de crecer en un medio con baja

osmolaridad, teniendo como única fuente de carbono y nitrógeno a la GB o la colina (Smith *et al.*, 1988). Estos autores han propuesto una vía para el metabolismo del osmolito (Fig. 3) y han encontrado que una alta osmolaridad en el medio disminuye la actividad de las enzimas involucradas en el catabolismo de GB, pero no de aquellas que se involucran en su síntesis desde colina (Smith *et al.*, 1988). De esta forma el estrés osmótico puede llevar a una acumulación del osmoprotector en *S. meliloti*.

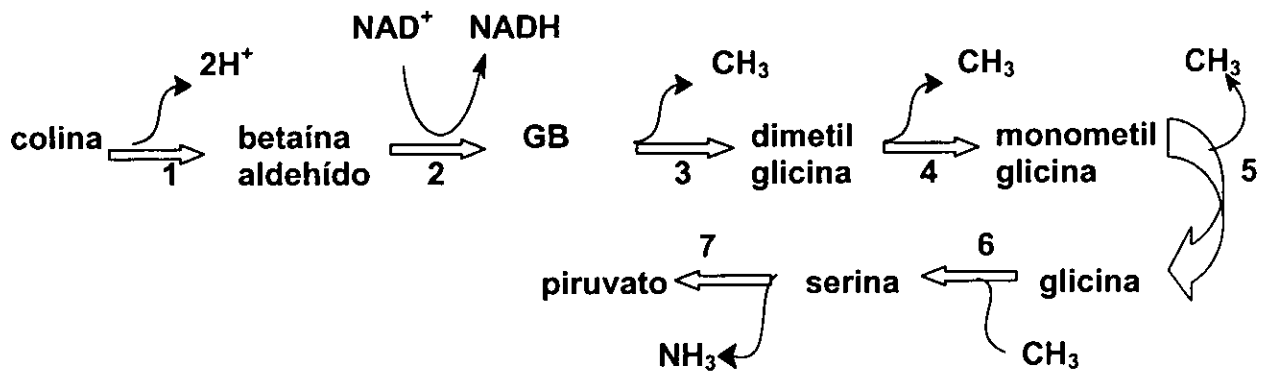


Figura 3. Propuesta para el metabolismo de la GB en *S. meliloti*. Las enzimas que catalizan las reacciones son: 1, colina oxidasa; 2, betaina aldehído deshidrogenasa; 3, glicinobetaina transmetilasa; 4, dimetilglicina deshidrogenasa; 5, monometilglicina deshidrogenasa; 6, serina transhidrometilasa; 7, serina deshidratasa (Obtenido de Smith *et al.*, 1988).

II.2. La bacteria *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que incluye a los géneros *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. *P. aeruginosa* es un bacilo Gram negativo ubicuo, aerobio y cuyo movimiento se da vía un único flagelo polar. Es un patógeno oportunista que causa infecciones en el sistema respiratorio, en el tracto urinario y en diversos tejidos blandos. Provoca dermatitis, bacteremia y diversas infecciones sistémicas, particularmente en víctimas de quemaduras severas, pacientes con cáncer, SIDA, fibrosis quística o leucemia; todos ellos inmunodeprimidos (Bradley, 1997; Todar, 1997).

Las bacterias de la familia *Pseudomonadaceae* tienen, en general, una gran capacidad metabólica, lo que les permite crecer en diversas fuentes de carbono (Stanier, *et al.*, 1966). *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1975; Nagasawa *et al.*, 1976), como *E. coli* (Landfald y Strom, 1986), puede oxidar la colina hasta GB, teniendo como intermediario a la betaína aldehído (Fig. 4). También, como en otras bacterias, una concentración de 200 μM de GB en el medio de crecimiento permite que *P. aeruginosa* incremente su tolerancia al estrés osmótico, provocado por concentraciones altas de NaCl (D'souza-Ault *et al.*, 1993). A diferencia de *E. coli* (Perroud y Le Rudulier, 1985), pero a semejanza de *S. meliloti* y *Xanthomonas translucens* (Bernard *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1988; Mori *et al.*, 1992), *P. aeruginosa* no sólo utiliza la GB como osmoprotector, sino también como una fuente de carbono y nitrógeno (Nagasawa *et al.*, 1976). Así, en *P. aeruginosa* la GB juega un papel dual, como osmoprotector y como intermediario del catabolismo de colina. No se sabe cuál es la ruta que utiliza *P. aeruginosa* para degradar la GB y así poder aprovechar el carbono y nitrógeno que ésta posee. No obstante, se podría pensar en una ruta metabólica similar a la encontrada en *S. meliloti* (Figura 3) (Smith *et al.*, 1988).

Como se muestra en la Figura 4, *P. aeruginosa* puede convertir diversos compuestos en colina (Lucchesi *et al.*, 1989; Domenech *et al.*, 1991). Estas moléculas, junto con la colina y la GB, suelen encontrarse en los tejidos infectados por *P. aeruginosa* en concentraciones suficientes como para considerarlas como una adecuada fuente de carbono y nitrógeno. Así, la invasión de *P. aeruginosa* en el ojo humano parece ser facilitada por la presencia de concentraciones relativamente altas

de acetilcolina en el epitelio de la córnea (Pesin y Candia, 1982). En el caso del pulmón la fosfatidilcolina constituye aproximadamente un 70% del total del surfactante (Wright y Clements, 1987).

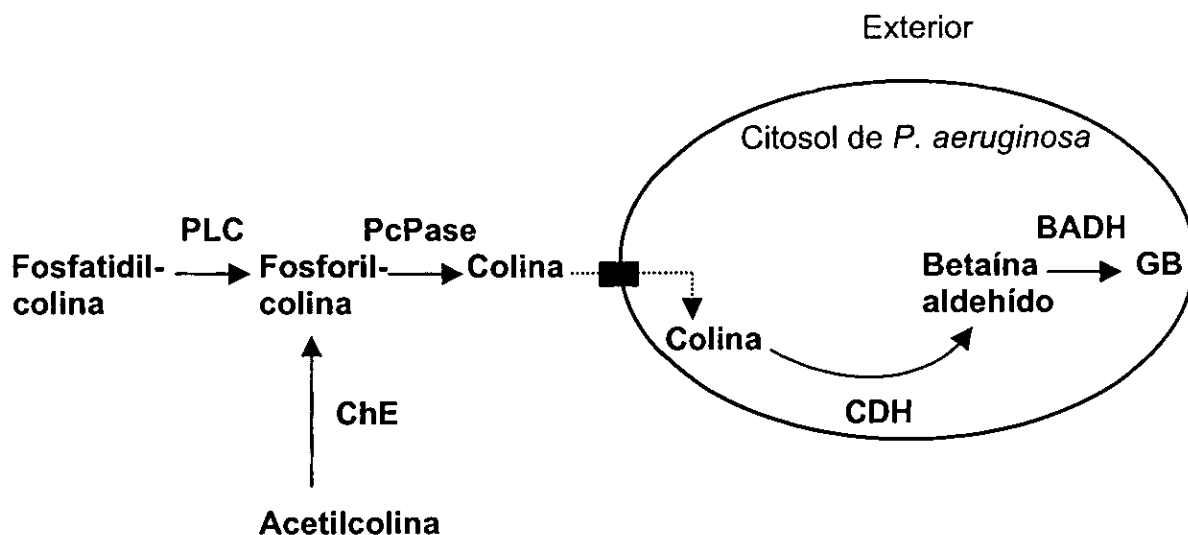


Figura 4. Síntesis de la GB en *P. aeruginosa*. PLC, fosfolipasa C; PcPase, fosfatasa de fosforilcolina; ChE, acetilcolinesterasa; CDH, colina deshidrogenasa; BADH, betaína aldehído deshidrogenasa.

En relación con las vías urinarias, otro de los sitios en donde puede infectar *P. aeruginosa*, se ha propuesto (Rennick, 1981) que la colina presente en la orina podría también proteger a la bacteria del desbalance osmótico generado por el cloruro de sodio y otros electrolitos que ahí se encuentran (Chambers y Kunin, 1987). Sin embargo, considerando que la colina no posee propiedades osmoprotectoras *per se* (Styvold, 1986), podemos pensar que la adaptación de la bacteria a las condiciones que prevalecen en las vías urinarias debe involucrar a las enzimas que participan en la síntesis de la GB.

La fosfolipasa C de *P. aeruginosa* se induce por la presencia de fosforilcolina, colina o la GB en el medio (Lucchesi *et al.*, 1989; Ostroff *et al.*, 1990). También la acetilcolina y la colina provocan un aumento en las actividades de la fosforilcolina fosfatasa y de la acetilcolinesterasa (Domenech *et al.*, 1991; Shortridge *et al.*, 1992; Lisa *et al.*, 1994) así como de la BADH (Nagasawa *et al.*, 1976). Sin embargo, un estudio con cepas mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en el gen que codifica para la BADH,

demuestra que el agente inductor de la fosfolipasa C es la GB o algún producto de su degradación, mas no sus precursores (Sage *et al.*, 1997). Entonces cabe la posibilidad, de que las otras enzimas (la PcPase y la ChE) sean inducidas por el mismo compuesto, siendo la enzima BADH clave en la virulencia de *P. aeruginosa*. En este mismo trabajo (Sage *et al.*, 1997) se menciona que la mutante de *P. aeruginosa* sin la BADH es incapaz de crecer bajo un estrés osmótico y colina, o con el estrés osmótico más colina y GB, debido al efecto tóxico de la betaína aldehído que se acumula en la mutante. Lo anterior nos lleva a pensar que la enzima BADH puede ser un blanco adecuado para la acción de agentes antimicrobianos, por lo que es necesario conocer más sobre las características de esta enzima. A continuación se abordarán algunos aspectos de la BADH y de la familia de enzimas a la que pertenece, las aldehído deshidrogenasas.

II.3. Las enzimas aldehído deshidrogenasas

Los aldehídos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, pudiéndoseles encontrar en las frutas, en los vegetales y en el humo del cigarro. *In vivo*, la mayoría de ellos se presentan como intermediarios en el metabolismo de otros compuestos. A pesar de que algunos aldehídos poseen efectos benéficos, como el caso del retinaldehído en el proceso de la visión, la mayoría tienen efectos negativos, incluyendo citotoxicidad, mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogenicidad (Lindhal, 1992) Debido a esto, es importante la eliminación selectiva de los aldehídos en los sistemas biológicos para evitar sus efectos deletéreos. Entre las formas más efectivas de eliminación de estos compuestos está su oxidación irreversible hasta ácidos carboxílicos, por acción de las aldehído deshidrogenasas (ALDHs) que se encuentran distribuidas desde las bacterias hasta los mamíferos. La variedad de sustratos que aceptan las ALDHs incluye no solo aldehídos alifáticos y aromáticos, sino también aldehídos 2-halogenados, 2-hidroxi y 2-enoico.

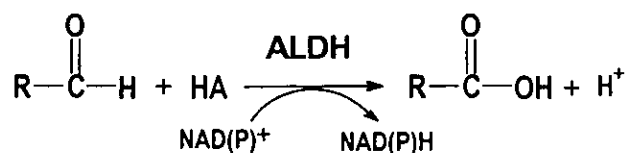


Figura 5. Reacción general de las aldehído deshidrogenasas.

En la reacción de algunas ALDHs (clase I) el agua participa como un reactante, en cuyo caso dentro del componente HA de la reacción de la Figura 5, A=OH. Cuando A representa un fosfato, un arsenato o un mercaptano, la enzima se clasifica como de la clase II. La clase III se ha reservado para las enzimas que combinan algunas de las funciones antes mencionadas (Jakoby, 1963). Sin embargo, existen otras clasificaciones para estas enzimas. Así, según su compartimentalización celular se denominan de la clase I (citosólicas), clase II (mitocondriales) y clase III (microsomales y tumorales) (Lindhal y Hempel, 1991). Existen también ALDHs que requieren un sustrato específico, entre las que encontramos a la semialdehído deshidrogenasa del succinato (Niegmann, *et al.*, 1992), la del glutamato (Krzywicki y Brandriss, 1984), la del metilmalonato (Kedishvili *et al.*, 1992), la del 2-hidroxiuconato (Nordlund y Shingler, 1990), así como a la betaína aldehído deshidrogenasa (Nagasawa *et al.*, 1976; Falkenberg y Strom, 1990; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Dragolovich y Pierce, 1994). Únicamente en el humano se conocen 12 clases de ALDHs, cuyos genes se localizan en diferentes cromosomas (Yoshida *et al.*, 1998).

Racker, en 1949, demostró por primera vez la existencia de una ALDH en el hígado de bovino (Racker, 1949). Fue hasta 1970 cuando se purificó por primera vez una ALDH de la levadura (Clark y Jacoby, 1970, citado por MacGibbon *et al.*, 1979) y hasta 1972 que esta meta se logró con la enzima de un mamífero (Feldman y Weiner, 1972).

La primera secuencia de aminoácidos de una ALDH se conoció en 1984 (Hempel *et al.*, 1984) y es gracias a estos estudios de secuenciación a nivel proteico, de los genes o de los cDNAs que codifican para estas enzimas, que actualmente se conoce la secuencia aminoacídica de más de 50 ALDHs de animales, hongos, protozoarios y bacterias (Yoshida *et al.*, 1998). Un pequeño número de estas secuencias (sólo 16) ha sido comparado, encontrándose que de aproximadamente 500 aminoácidos que

conforman la subunidad, únicamente 23 están conservados (Hempel et al., 1993); algunos de éstos podrían ser componentes del sitio activo.

Los estudios cinéticos realizados con distintas aldehído deshidrogenasas señalan que estas enzimas tienen un mecanismo cinético ordenado, en el que el nucleótido es el primer sustrato (Rysewski y Pietruszko, 1980; Rivett y Tipton, 1981). La figura 6 presenta los pasos propuestos para explicar el mecanismo químico de esta reacción. Se propone que las ALDHs funcionan con una catálisis covalente, en donde se realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo carbonilo del aldehído para que después el tiohemiacetal formado sea oxidado a un tioéster (Weiner et al., 1995). Estos mismos autores también sugieren que el sitio activo debe poseer una base general que ayude en el proceso de desacilación del intermediario tioéster.

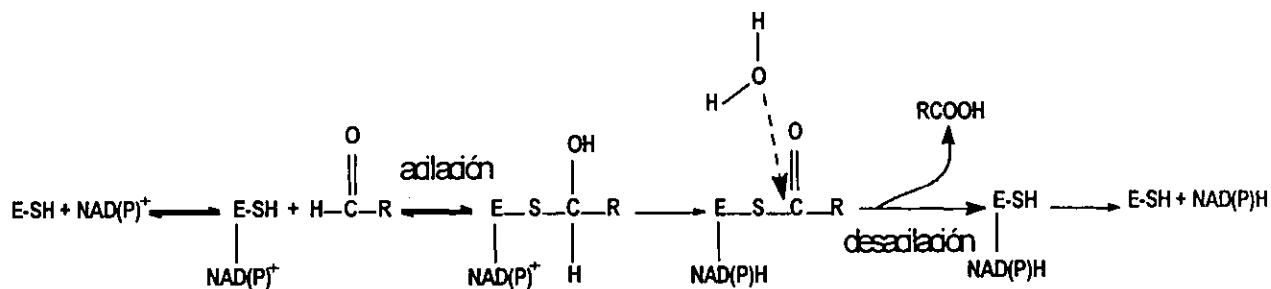


Figura 6. Mecanismo químico de la reacción catalizada por las ALDHs (modificado del de Weiner et al., 1995)

Los estudios por mutagénesis dirigida a un sitio específico (Farres et al., 1995; Wang y Weiner, 1995) realizados con la ALDH de mitocondria del hígado de mamífero, sugieren que la cisteína 302 es el residuo nucleofílico del sitio activo y el glutamato 268 la base general necesaria para la activación inicial de la cisteína 302, mas que para la desacilación antes mencionada. Otra investigación más reciente, utilizando también análisis de mutaciones (Sheikh et al., 1997) muestra que los cambios en el glutámico 399 y en la lisina 192, que se enlazan a los anillos de la ribosa del nucleótido (Steinmetz et al., 1997), provocan que el paso limitante de la ALDH de la mitocondria del hígado humano cambie de ser la desacilación a ser la transferencia del hidruro (desde el tiohemiacetal al NAD(P)⁺, en la Figura 6). Estos dos aminoácidos parecen

estar involucrados en la estabilización del estado de transición a través de su unión con la ribosa (Ni y Weiner, 1997).

Recientemente también se han determinado las estructuras tridimensionales de tres ALDHs: la de la ALDH2 de bovino, un tetrámero (Steinmetz *et al.*, 1997); la de la ALDH3 de rata, un dímero (Liu *et al.*, 1997) y la de la ALDH9 de bacalao (*Gadus callarias*), un tetrámero con actividad de BADH (Johansson *et al.*, 1998). Se ha encontrado que, a pesar de que difieren en su estructura cuaternaria y en el tamaño de su subunidad, todas ellas tienen una estructura tridimensional similar. Poseen 3 dominios: uno de enlace a la coenzima, un dominio catalítico y otro de oligomerización. Sin embargo, las dos enzimas tetraméricas (ALDH2 y ALDH9) difieren de la dimérica (ALDH3) en la forma en que unen el NAD(P)⁺.

II.4. La enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH)

Una aldehído deshidrogenasa cuyo papel es trascendental en la adaptación de los organismos al estrés osmótico es la BADH. Esta enzima se involucra en la síntesis de la GB, a través de la siguiente reacción:

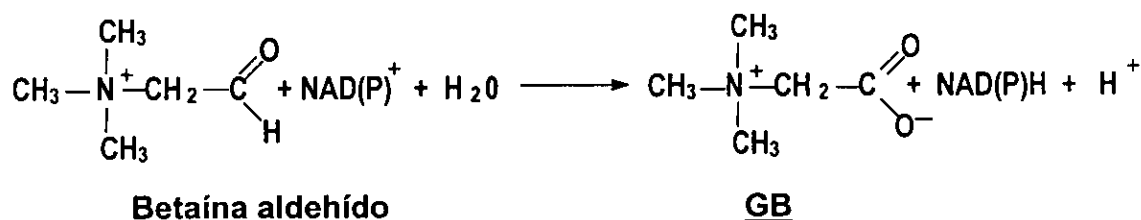


Figura 7. Reacción catalizada por la BADH

Como ya se mencionó en párrafos anteriores, la expresión de BADH en *E. coli* se estimula por el estrés osmótico (Landfald y Strom, 1986; Styrvold *et al.*, 1986). En relación con las plantas, en donde la oxidación de la colina hasta betaina se realiza en el cloroplasto (Hanson *et al.*, 1985), la aplicación de un déficit hídrico en las hojas de *Amaranthus hypochondriacus* L. produce un incremento en la actividad de la BADH, desde niveles no detectables hasta 1 unidad por mg de proteína (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Por otro lado, la salinización gradual de las plantas de *Spinacia oleracea* lleva a un aumento del 300% en esta actividad (Weigel *et al.*, 1986).

Consistente con estos resultados, el RNAm y la proteína de BADH también se acumulan en *S. oleracea* bajo tensión salina (Weretilnyk, 1989) y en *A. hypochondriacus* en respuesta al déficit de agua o a las altas concentraciones de sal (Legaria *et al.*, 1998). En plantas de *Hordeum vulgare*, en las que la salinización produce un aumento de tres veces en la actividad de BADH (Arakawa, *et al.*, 1990), el incremento en los niveles de esta proteína se da no sólo por la adición de NaCl al medio de crecimiento sino también por la presencia de polietilenglicol (Arakawa *et al.*, 1992).

La BADH ha sido purificada de las bacterias *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976), *E. Coli* (Falkenberg y Strom, 1990), *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1997) y *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992); de los vegetales *A. hypochondriacus* (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y *S. oleracea* (Arakawa *et al.*, 1987; Weretilnik y Hanson, 1989); de los animales se ha aislado del hígado humano (Kurys *et al.*, 1989) y del de la rata (Chern y Pietruszko, 1999), de la mitocondria del tejido cardiaco del cangrejo *Limulus polyphemus* (Dragolovich y Pierce, 1994) y del riñón de cerdo (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998).

El análisis directo de la proteína ha permitido conocer la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de las BADHs de *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992) y de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990). Los estudios del gen que codifica para esta enzima han mostrado la estructura primaria de la BADH de *E. coli* (Boyd *et al.*, 1991), *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996), *S. meliloti* (Pocard *et al.*, 1997), *S. oleracea* (Weretilnyk y Hanson, 1990), *Beta vulgaris* (McCue y Hanson, 1992), *H. vulgare* (Ishitani *et al.*, 1995), *Atriplex hortensis* (Xiao *et al.*, 1995), *Sorghum bicolor* (Wood *et al.*, 1996), *Oriza sativa* (Nakamura *et al.*, 1997), *A. hypochondriacus* (Legaria *et al.*, 1998), hígado y cerebro humano (Kurys *et al.*, 1993; Kikonyogo y Pietruszko, 1996) e hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998). Después de comparar las secuencias de 11 de estas últimas enzimas, con ayuda del programa Building Clustalw Alignment (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/cgi/alignment>), hemos encontrado que 89 aminoácidos (17.8%), de los aproximadamente 500 que conforman la subunidad de estas enzimas, están conservados. Entre estos 89 residuos se encuentran aquellos que ya mencionamos como esenciales para la ALDH2 de mamífero (Farres *et al.*, 1995;

Wang y Weiner, 1995), así como los que estabilizan el estado de transición (Ni y Weiner, 1997).

El grado de especificidad por su sustrato varía entre las diferentes BADHs. Las enzimas del hígado humano (Kurys *et al.*, 1989; Ambrosiak y Pietruszko, 1991) y de rata (Chern y Pietrusko, 1999) pueden utilizar diversos aminoaldehídos, mientras que la de *B. vulgaris* utiliza, además de la BA, el 3-aminopropionaldehído, el 3-dimetilsulfoniopropionaldehído y el 4-aminobutiraldehído (Trossat *et al.*, 1997); estos dos últimos compuestos también son sustratos de la BADH de *A. hypochondriacus* (Vojtechova *et al.*, 1997). Por su parte, las BADHs de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990), *P. aeruginosa* (Nagasawa, 1976), *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1997) y la de mitocondria del músculo cardíaco del cangrejo *L. poliphemus* (Dragolovich y Pierce, 1994) son altamente específicas para la BA.

En relación a sus características cinéticas, como se mencionó anteriormente, las aldehído deshidrogenasas de hígado de mamífero han sido ampliamente estudiadas; sin embargo, son pocas las investigaciones que se han realizado con la BADH de plantas y microorganismos. De hecho, sólo recientemente estas características han sido valoradas en la enzima de hoja de *A. hypochondriacus* (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). Esta enzima, como la ALDH de mamífero, presenta un mecanismo ordenado en el que el NAD^+ es el primer sustrato; sin embargo, en forma diferente a todas las ALDHs estudiadas, el mecanismo de la BADH de *A. hypochondriacus* es de tipo Iso, en el que existen dos formas de la enzima libre (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993).

En bacterias, los estudios realizados sobre las propiedades cinéticas de las BADHs se pueden considerar como superficiales (Nagasawa *et al.*, 1976; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1992). En ninguna de ellas se ha estudiado el mecanismo de la reacción que catalizan. Por esta razón, y refiriéndonos específicamente a la BADH de *P. aeruginosa* que, como ya se dijo antes, puede ser un buen blanco para la acción de agentes microbianos, en el presente trabajo se plantearon la hipótesis y los objetivos siguientes:

Handwritten text, possibly a signature or initials, consisting of several stylized, overlapping loops and lines.

III. HIPÓTESIS

Como se señala en párrafos anteriores, los estudios realizados hasta ahora con aldehído deshidrogenasas indican que poseen, en lo general, características estructurales y funcionales propias de este grupo de enzimas. Sin embargo, estos trabajos también muestran diferencias más específicas entre ellas, algunas de las cuales parecen estar relacionadas con la función particular que desarrollan. La misma situación se presenta entre las betaína aldehído deshidrogenasas de diferentes organismos, razón por la cual en esta investigación se espera encontrar que la BADH de *P. aeruginosa* tenga características estructurales y funcionales similares a las de su clase, pero también que presente diferencias relacionadas con la forma específica en que trabaja en dicha bacteria.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las características fisicoquímicas y cinéticas de la BADH de *P. aeruginosa*.

IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Purificar a homogeneidad la BADH de *P. aeruginosa* y obtener un anticuerpo convencional específico.

2. Conocer las siguientes características de la enzima:
 - a) La masa molecular y el número de subunidades
 - b) El punto isoeléctrico de la enzima nativa y desnaturalizada
 - c) La composición de aminoácidos y la secuencia de éstos en el extremo amino terminal de la proteína
 - d) El pH óptimo para la actividad
 - e) La energía de activación de la reacción catalizada
 - f) La especificidad por sustratos

III. HIPÓTESIS

Como se señala en párrafos anteriores, los estudios realizados hasta ahora con aldehído deshidrogenasas indican que poseen, en lo general, características estructurales y funcionales propias de este grupo de enzimas. Sin embargo, estos trabajos también muestran diferencias más específicas entre ellas, algunas de las cuales parecen estar relacionadas con la función particular que desarrollan. La misma situación se presenta entre las betaína aldehído deshidrogenasas de diferentes organismos, razón por la cual en esta investigación se espera encontrar que la BADH de *P. aeruginosa* tenga características estructurales y funcionales similares a las de su clase, pero también que presente diferencias relacionadas con la forma específica en que trabaja en dicha bacteria.

IV. OBJETIVOS

IV.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las características fisicoquímicas y cinéticas de la BADH de *P. aeruginosa*.

IV.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Purificar a homogeneidad la BADH de *P. aeruginosa* y obtener un anticuerpo convencional específico.

2. Conocer las siguientes características de la enzima:
 - a) La masa molecular y el número de subunidades
 - b) El punto isoeléctrico de la enzima nativa y desnaturalizada
 - c) La composición de aminoácidos y la secuencia de éstos en el extremo amino terminal de la proteína
 - d) El pH óptimo para la actividad
 - e) La energía de activación de la reacción catalizada
 - f) La especificidad por sustratos

- g) La estabilidad de la enzima bajo diferentes condiciones (altas temperaturas, dilución y composición del amortiguador).
3. Caracterizar cinéticamente a la BADH de *P. aeruginosa*, estableciendo su mecanismo cinético a través de:
- a) La obtención de los patrones de velocidad inicial con betaína aldehído y los dos nucleótidos (NAD^+ y NADP^+)
 - b) Estudios de inhibición con los productos (GB y NAD(P)H) y los inhibidores sin salida (ADP y colina) a bajas concentraciones de sustratos
 - c) Experimentos de inhibición con los sustratos (BA y NAD(P)^+ y de unión de los nucleótidos (NAD^+ y NADP^+) a la enzima.

Además, con la finalidad de conocer en un futuro los aminoácidos que forman parte del sitio activo de esta enzima o los que son importantes para la estabilidad de la estructura nativa, también se planteó:

4. Clonar el gen de la BADH de *P. aeruginosa* y sobreexpresar la enzima en *E. coli*.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Los materiales y métodos que se emplearon para cumplir los tres primeros objetivos se describen en los artículos que forman parte de esta tesis, a los que llamaremos Artículo I y II (Secciones VI.1. y VI.2., respectivamente). Las técnicas utilizadas para el cuarto objetivo se mencionan a continuación.

V.1. Clonación del gen *badh* y sobreexpresión de la BADH en *E. coli*

V.1.1. Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos diseñados para el lado amino (BADHPs1) y carboxilo (BADHPs2) se describen a continuación. La parte subrayada es el sitio de corte para NdeI (en BADHPs1) y para EcoRI (en BADHPs2). La síntesis fue realizada por GIBCO BRL, de Life Technologies.

BADHPs1

5' GGAATTC ATG GCC CGA TTC GAA GAA CAG AAG CTC 3'

BADHPs2

5' GGAATTC TCA GAA CAC CGA GGC GTA GTC GCC CAG 3'

Los oligonucleótidos se diluyeron con agua tridestilada estéril hasta una concentración de 35.6 y 58.9 μM , respectivamente, y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su uso posterior.

V.1.2. Aislamiento del DNA genómico de *P. aeruginosa*

Se aisló el DNA genómico de *P. aeruginosa* siguiendo un método descrito (Sambrook, *et al.*, 1989) que se basa en la ruptura de células con lisozima, proteinasa K y SDS y la posterior remoción de la pared celular, proteínas y polisacáridos complejados con el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB). El DNA se purificó con un tratamiento con fenol y se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior utilización como molde. La cantidad del DNA genómico obtenido a partir de 5 ml de un cultivo de *P.*

aeruginosa en fase estacionaria de crecimiento en medio LB, fue de aproximadamente 60 µg, determinada en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) y teñido con bromuro de etidio (0.2 µg/ml). Este mismo tipo de gel, junto con el marcador de DNA de 1 Kb (Gibco BRL, Life Technologies), se utilizó en los experimentos cuyo objetivo era separar algún fragmento de DNA o conocer su tamaño.

V.1.3. Amplificación por PCR y clonación del gen de la *badh*

Se utilizó la enzima Taq DNA polimerasa (Gibco BRL, Life Technologies) para amplificar el gen de la BADH de *P. aeruginosa*. La mezcla de reacción para la PCR (50 µl) contenía 250 ng de DNA genómico de *P. aeruginosa*, 100 nM de los oligodesoxinucleótidos BADHPs1 y BDHPs2, 200 µM de cada uno de los 4 desoxinucleótidos (grado PCR), 1.5 mM de MgCl₂ y 0.9 unidades de Taq DNA polimerasa. La reacción fue iniciada con la adición de la polimerasa a una temperatura de 95 °C. Las condiciones de corrida fueron 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 30 s a 65 °C y 2 min a 72 °C; al final de la corrida se dieron 10 min a 72 °C. Los productos en la mezcla de reacción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa. Se limpió el producto de PCR (una banda con tamaño aproximado de 1500 pb) con el sistema Gene Clean (BIO 101), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Se digirió el producto de PCR (aproximadamente 4 µg) y 5 µg del vector pCAL-n (Stratagene), durante 18 h (37 °C) con la enzima *Nde* I (Gibco BRL, Life Technologies). Los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y purificados con el sistema Gene Clean. Después se procedió a cortarlos por 5 h (37 °C) con la enzima *EcoR* I (Gibco BRL, Life Technologies) y a desfosforilar el vector durante 1 h (37 °C). Se limpiaron los productos de la digestión tratándolos con fenol y luego se ligaron entre sí (2 h a 37 °C) con la DNA ligasa T4 (Gibco BRL, Life Technologies) en presencia de 1 mM de ATP. Para ello se utilizaron las siguientes proporciones molares de inserto/vector: 2/1, 4/1, 6/1 y 8/1.

V.1.4. Transformación de *E. coli* e inducción de la síntesis de la BADH

Se colocaron 100 μ l de la cepa de *E. coli* XL1-Blue competente (Stratagene), junto con 10 μ l de cada una de las mezclas utilizadas para la reacción de la DNA ligasa, en tubos Eppendorf de 1.5 ml preenfriados en hielo. Se tuvo un control de transformación agregando 1 μ l del plásmido pUC18 a 100 μ l de las células competentes. Se mantuvieron todos los tubos durante 30 min en hielo para posteriormente colocarlos durante 23 segundos a 42 °C, agregando inmediatamente después 0.9 ml de medio LB a cada uno de ellos. Se incubaron los tubos a 37 °C durante 1 h con una agitación de 250 rpm y 100 μ l de cada uno se esparcieron en cajas de Petri conteniendo LB con carbenicilina (50 μ g/ml). Los 0.9 ml restantes de cada tubo se centrifugaron a 3000 X g durante 5 min y el precipitado se resuspendió en 100 μ l de LB para después esparcirlos en cajas con LB y carbenicilina. Se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Las células transformadas con pUC18 mostraron una eficiencia de 3.4×10^7 UFC/ μ g del plásmido. La proporción 6/1 de inserto/vector presentó 69 colonias, de las que 10 fueron seleccionadas para purificar su DNA plasmidal (Sambrook *et al.*, 1989). Tres de estas muestras de DNA se utilizaron para transformar *E. coli* BL21(DE3)pLysS (Stratagene) de la manera que se describió para la cepa XL1-Blue. Las células BL21(DE3)pLysS transformadas fueron crecidas a 37 °C toda la noche en medio LB líquido (con 50 μ g de carbenicilina/ml), para después resembrar 75 μ l de cada uno de los cultivos en 3 ml de LB con carbenicilina fresco. Después de 1 1/2 h de haber resembrado, y con una turbidez de los cultivos de 0.6 unidades de absorbencia, se tomaron 25 μ l de cada uno de ellos para mezclarlos con el mismo volumen de la solución de muestra 2X con SDS (Laemmli, 1970) y guardarlos a -20 °C (control sin inducción); al mismo tiempo se agregó IPTG a cada tubo hasta una concentración final de 1 mM para inducir la síntesis de BADH. A las 1.5, 3, y 5 h después de haberse iniciado la inducción se volvieron a mezclar 25 μ l de cada cultivo con 25 μ l de la solución de muestra 2X, guardándose a -20 °C para su uso posterior. El volumen restante de cada cultivo (con 5 h de inducción) se almacenó a 4 °C para posteriormente medir la actividad de BADH.

V.1.5. Análisis por electroforesis e inmunorrélicas

Se descongelaron las muestras previamente almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después se calentaron en un baño María a $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 min; Se separaron $20\text{ }\mu\text{l}$ de cada una de ellas por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8% con SDS (Laemmli, 1970), utilizando una cámara Miniprotean II (Bio-Rad). Al final se tiñeron con azul de Coomassie R-250.

Otros $20\text{ }\mu\text{l}$ de cada muestra, desnaturalizadas con SDS y ebullición, se separaron en geles de poliacrilamida como se describió antes, realizando después la técnica de inmunorrelicas (Towbin et al., 1979). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en una cámara Mini Trans-Blot (Bio-Rad) que contenía Tris-HCl 25 mM (pH 8.3), glicina 192 mM y metanol 10% (v/v). Como primer anticuerpo se utilizó uno policlonal obtenido contra la BADH de *P. aeruginosa* (Artículo I) en una dilución de 1:500. El segundo anticuerpo fue una IgG de chivo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano, utilizado a una concentración de 1:1000. Se observó el anticuerpo unido por medio de la reacción de la peroxidasa con el substrato 4-cloro-1-naftol (Towbin et al., 1979).

V.1.6. Obtención de extractos y medición de la actividad de la BADH

Para desintegrar las células, que se expusieron al IPTG durante 5 horas y se almacenaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se utilizó un sonicador Branson a 60 watts durante 90 s y una temperatura de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El homogeneizado se centrifugó después a $14,500\text{ X g}$ durante 30 min. Se utilizarón cinco μL del sobrenadante (extracto celular) para medir la actividad de la BADH, siguiendo el cambio de absorbencia a 340 nm (formación de NADPH) en un volumen de 0.5 mL de amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 8.0, que contenía betaina aldehído 1 mM y NADP^+ 0.3 mM. Se cuantificó la proteína total del extracto celular con el método de Bradford (Bradford, 1976).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mayoría de los resultados obtenidos de esta investigación, así como el análisis y discusión de éstos, se encuentran en los Artículos I y II (puntos VI.1. y VI.2. de esta sección). Del punto VI.3. al VI.6. se muestra información adicional sobre las características fisicoquímicas y se aportan datos sobre la cinética de la enzima. Al final de la sección VI se da una discusión integral de los principales resultados y la importancia biológica que estos poseen.

VI.1. Artículo I

**“Rapid Purification and Properties of Betaine Aldehyde
Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*”**

Rapid Purification and Properties of Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*

ROBERTO VELASCO-GARCÍA,¹ CARLOS MÚJICA-JIMÉNEZ,²
GUILLERMO MENDOZA-HERNÁNDEZ,³ AND
ROSARIO A. MUÑOZ-CLARES^{2*}

Laboratorio de Osmorregulación, ENEP Iztacala,¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,²
and Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina,³ Universidad Nacional
Autónoma de México, México D.F., 04510, México

Received 21 July 1998/Accepted 1 December 1998

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) (EC 1.2.1.8) catalyzes the last, irreversible step in the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline. In *Pseudomonas aeruginosa* this reaction is also an obligatory step in the assimilation of carbon and nitrogen when bacteria are growing in choline or choline precursors. We present here a method for the rapid purification to homogeneity of this enzyme by the use of ion-exchange and affinity chromatographies on 2',5'-ADP-Sepharose, which results in a high yield of pure enzyme with a specific activity at 30°C and pH 7.4 of 74.5 U/mg of protein. Analytical ultracentrifugation, gel filtration, chemical cross-linking, and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis suggest that BADH from *P. aeruginosa* is a homodimer with 61-kDa subunits. The amino acid composition and the N-terminal sequence of 21 amino acid residues showed significant similarity with those of the enzymes from *Xanthomonas translucens* and *Escherichia coli*. Neither BADH activity nor BADH protein was found in cell extracts from bacteria grown in the absence of choline. In contrast to other BADHs studied to date, the *Pseudomonas* enzyme cannot use positively charged aldehydes other than betaine aldehyde as substrates. The oxidation reaction has an activation energy of 39.8 kJ mol⁻¹. The pH dependence of the velocity indicated an optimum at pH 8.0 to 8.5 and the existence of two ionizable groups with macroscopic pK values of 7.0 ± 0.1 and 9.7 ± 0.1 involved in catalysis and/or binding of substrates. The enzyme is inactivated at 40°C, but activity is regained when the heated enzyme is cooled to 30°C or lower. At the optimum pH of 8.0, the enzyme is inactivated by dilution, but it is stable at pH 6.5 even at very low concentrations. Also, *P. aeruginosa* BADH activity is rapidly lost on removal of K⁺. In all cases studied, inactivation involves a biphasic process, which was dependent on the enzyme concentration only in the case of inactivation by dilution. NADP⁺ considerably protected the enzyme against these inactivating conditions.

It has been suggested that the virulence of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* might be related to its ability to adapt to osmotic stress (45), a stressful condition which is frequently present at infection sites, such as in lungs of patients suffering from cystic fibrosis (30). It is known that *P. aeruginosa* is able to grow under osmotic stress, particularly in the presence of the osmoprotectant glycine betaine or compounds such as phosphatidylcholine, acetylcholine, phosphorylcholine, and choline (13, 27), which produce glycine betaine through the sequence of reactions shown in Fig. 1.

It is interesting that the glycine betaine precursors are very abundant at infection sites (39, 41); for instance, phosphatidyl choline constitutes 70% of the lung surfactant (58). Accordingly, the virulence of *P. aeruginosa* has been linked to the expression of phospholipase C (37), which is induced by phosphorylcholine, choline, and glycine betaine (28, 37). In addition, *P. aeruginosa* can grow on choline or glycine betaine as the sole carbon, nitrogen, and energy source (35); therefore, glycine betaine may play the dual role of an osmoprotectant and a metabolic intermediate in the catabolism of choline or choline precursors. In this respect, *P. aeruginosa* is similar to *Xanthomonas translucens* (34) and *Sinorhizobium meliloti* (2, 46) but is different from *Escherichia coli*, in which glycine betaine is involved only in the response of the bacteria to osmotic stress

(24). Accordingly, appreciable levels of activity of betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) (EC 1.2.1.8), the enzyme which catalyzes the final, irreversible step in the synthesis of glycine betaine, are found in *P. aeruginosa* cells grown in choline or choline precursors (35). Recently, Sage et al. (43) reported on a *P. aeruginosa* mutant deficient in BADH activity which is not able to grow either in choline or in glycine betaine plus choline, due to a toxic effect of the BADH substrate, betaine aldehyde, which accumulates in this mutant when choline is present.

BADH activity thus appears to be crucial for bacterial growth under the conditions of infection, i.e., osmotic stress plus an abundance of choline or choline precursors, and therefore appears to be a suitable target for antimicrobial agents. The development of selective antimicrobial agents would require much more information about the kinetic and physicochemical properties of the enzyme as well as easily available pure enzyme, which could be used to screen new compounds. Limited information on this enzyme was published more than two decades ago. The data were obtained with an enzyme purified by using a cumbersome and inefficient procedure which yielded enzyme with a very low specific activity (35). Recently, a different and much more efficient purification protocol was published (42), but it still involved four chromatographic steps, and the enzyme was not further characterized. Therefore, because of the importance of understanding the biochemical basis of the response of microorganisms to osmotic stress and the importance of possible future efforts in the development of drugs against *P. aeruginosa*, we found it of interest to develop a quick procedure for purifying BADH from this pathogen to homo-

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, Mexico. Phone: (52) 5-6225276. Fax: (52) 5-6225329. E-mail: clares@servidor.unam.mx.

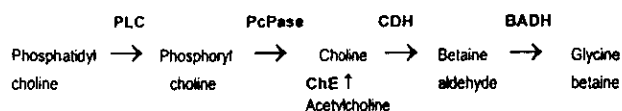


FIG. 1. Production of glycine betaine. PLC, phospholipase C; PcPase, phosphorylcholine phosphatase; ChE, acetyl cholinesterase; CDH, choline dehydrogenase.

geneity with high yields and to further investigate some of its physicochemical and kinetic properties. In addition, since N-terminal sequence data from the purified enzyme and antibodies against the pure enzyme would be valuable tools for cloning and expression of the corresponding gene, we determined the N-terminal sequence of and obtained monospecific polyclonal antibodies against this enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and biochemicals. Betaine aldehyde chloride, glycine betaine (free base), choline chloride, NAD(P)⁺, NADPH, dithiothreitol (DTT), Tris, β -mercaptoethanol, urea, phenazine methosulfate, nitroblue tetrazolium, and Coomassie brilliant blue G and R were obtained from Sigma (St. Louis, Mo.). EDTA and glycerol were from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Ampholines and nitrocellulose membranes were from Bio-Rad (Hercules, Calif.), and Immobilon-P^{SO} membrane was from Millipore (Bedford, Mass.). 3-Dimethylsulfonylpropionaldehyde was a kind gift from A. D. Hanson (University of Florida, Gainesville). γ -Aminobutyraldehyde (diethylacetal form) was from Aldrich (Milwaukee, Wis.). γ -Aminobutyraldehyde chloride was freshly prepared from the diethylacetal form by the procedure described by Flores and Filner (15). Materials for column chromatography were purchased from Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden). Freund's complete and incomplete adjuvants and horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit immunoglobulin G conjugate were from GIBCO BRL (Gaithersburg, Md.), and the enhanced chemiluminescence kit was from Pierce (Rockford, Ill.). All other chemicals, of analytical grade, were from standard suppliers.

Bacterial strains and culture conditions. *P. aeruginosa* PAO1, kindly provided by M. L. Vasil (University of Colorado Health Sciences Center, Denver) was used in all experiments. Cells were grown aerobically at 37°C in liquid media. The basal medium used to grow the cells was essentially the M63 minimal medium described by Miller (32), except that, for maximum induction of BADH, we used 20 mM choline as the sole carbon and nitrogen source. The medium (1,800 ml) was inoculated with a seed culture (36 ml) in the log phase and was grown on a gyratory shaker (150 rpm) at 37°C until the stationary phase was reached. The cells from 1.8 liters of culture medium were harvested by centrifugation at 3,000 \times g for 10 min and then resuspended in 90 ml of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.1 mM EDTA and 20 mM β -mercaptoethanol (buffer A).

Enzyme purification. All operations were carried out at 4°C. The resuspended cells were disintegrated by sonic oscillation (90 s at 60 W) in a Branson (Danbury, Conn.) Sonifier Cell Disruptor. The slurry was centrifuged at 14,500 \times g for 30 min. The supernatant (cell extract) was brought to 20% (wt/vol) sucrose (buffer B) and then applied to a Q-Sepharose Fast Flow column (1.8 by 6.5 cm) equilibrated with buffer B. The column was washed with the same buffer, and the enzyme was eluted with 110 ml of a linear salt gradient of 0 to 250 mM KCl in buffer B at a flow rate of 1 ml/min. Fractions with enzyme activity were pooled, and the pH was adjusted to 6.0 with diluted HCl. Following pH adjustment, the enzyme was applied to a 2',5'-ADP-Sepharose column (1.1 by 3.5 cm) equilibrated with buffer C (10 mM potassium phosphate [pH 6.0] containing 5 mM DTT, 20% [wt/vol] sucrose, 0.1 mM EDTA, and 25 mM KCl). After washing with buffer C (40 ml), the enzyme was eluted at a flow rate of 0.5 ml/min with 75 ml of a linear pH gradient, from 6.0 to 8.5, of buffer C. The enzyme eluted at pH 6.9. Fractions with enzyme activity were pooled, aliquoted, and stored at -20°C.

Enzyme assay. During the purification procedure, the BADH activity was assayed spectrophotometrically by monitoring the absorbance at 340 nm (NADPH formation) in a mixture (0.5 ml) consisting of 1.0 mM betaine aldehyde and 0.3 mM NADP⁺ in a 100 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0 (standard assay). A PU 8710 spectrophotometer (Philips, Cambridge, United Kingdom) equipped with a kinetics software package was used for the assays, which were conducted at 30°C in 1.0-cm-path-length cuvettes. All assays were initiated by addition of the enzyme. Initial steady-state rates were determined from the initial, linear portions of reaction progress curves. The initial rate of betaine aldehyde oxidation was proportional to the enzyme concentration over a range of 0.06 to 2.3 μ g of protein per ml of reaction mixture. Each determination was performed at least in duplicate. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μ mol of NADPH per min in our standard assay. Kinetics studies were performed by using the same spectrophotometric assay but varying the concentration of substrates.

The effect of pH on the activity of purified BADH was measured over the pH range of 6.0 to 9.5 in either 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.0 to 8.0) or 100 mM potassium pyrophosphate buffer (pH 8.0 to 9.5) under otherwise standard assay conditions. pH stability was determined by assaying the residual activity at pH 8.0 after preincubation of the enzyme (0.5 μ g/ml) in 100 mM potassium phosphate or potassium pyrophosphate buffer in a pH range of 6.0 to 9.5 for 2 min at 30°C.

Protein determination. Protein concentrations were determined by the Coomassie G dye-binding technique of Bradford (6) with bovine serum albumin as a protein standard. For the pure enzyme, the protein concentration was also calculated as described by Scopes (44) by measuring its absorbance at 205 nm in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.9) containing 0.1 mM EDTA, 20% (wt/vol) sucrose, and 25 mM KCl (buffer D). The two methods yielded protein concentrations that agreed very well. In column effluents, protein elution was monitored by measurements of A_{280} .

Gel electrophoresis and Western blot analysis. Acrylamide gel electrophoresis under dissociating conditions (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis [SDS-PAGE]) was performed with an 8% acrylamide resolving gel and a 4% acrylamide stacking gel as described by Laemmli (22). A MiniProtein II Electrophoresis Cell (Bio-Rad) was used, and the gels were stained with Coomassie brilliant blue (R-250) or with silver (36). Nondenaturing analytical electrofocusing in thin layers of polyacrylamide (8.4%, wt/vol) was done with slab gels prepared with 2.24% (wt/vol) ampholytes in the pH range of 3.0 to 10. 20% (vol/vol) glycerol, and 5 mM DTT. The gels were run at 250 V for 4 h with 20 mM NaOH in the cathode and 10 mM phosphoric acid in the anode. After focusing, the protein band exhibiting BADH activity was visualized by incubating the gel at 37°C with 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) containing 2.0 mM betaine aldehyde, 0.3 mM NADP⁺, 666 μ g of nitroblue tetrazolium per ml, and 66 μ g of phenazine methosulfate per ml. Denaturing analytical electrofocusing was carried out as previously described (48) except that Triton X-100 was used instead of Nonidet P-40. Protein bands were stained with Coomassie blue by standard methods.

Immunoblotting was carried out essentially by the method of Towbin et al (50). The enzyme (0.25 or 38 μ g of protein for the pure enzyme or cell extract, respectively) was subjected to SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane by semidry blotting in a Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad) with a transfer buffer containing 25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM glycine, and 10% (vol/vol) methanol. A polyclonal antibody raised against *P. aeruginosa* BADH at a dilution of 1:500 was used as the primary antibody. Anti-rabbit goat IgG (conjugated to horseradish peroxidase) at a dilution of 1:1,000 was used as the secondary antibody. Bound antibody was visualized by enhanced chemiluminescence according to the manufacturer's instructions.

Molecular mass analysis. Gel filtration of the native purified enzyme was performed with a Biosep Sec 3,000 column (Phenomenex, Torrance, Calif.) connected to a high-pressure liquid chromatography system (Waters, Milford, Mass.) equipped with an automated sample injector. The column was equilibrated and eluted at room temperature with 100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.9) containing 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, and 5 mM DTT at a flux of 1 ml/min. Elution profiles were determined by recording the absorbance of the eluate at 280 nm. The molecular mass of the enzyme subunit was estimated by SDS-PAGE, which was carried out as described above.

Sedimentation equilibrium experiments were performed with an Optima XL-A analytical ultracentrifuge equipped with scanner optics (Beckman, Fullerton, Calif.). The protein sample solution (500 μ g/ml) was exhaustively dialyzed against 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.9) containing 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 25 mM KCl, and 20% (wt/vol) sucrose. A portion of the dialysate was retained and used as the reference solution. The samples were placed in cells fitted with conventional aluminum-filled Epon double-sector centerpieces and quartz windows. Sedimentation equilibrium experiments were carried out at 44,000 \times g at 20°C. Scans were taken at 280 nm, with a spacing of 0.001 cm, in a step scan mode at intervals of 5 h. Sedimentation equilibrium was judged to have been reached when the difference in concentration distributions between consecutive scans was zero.

Cross-linking experiments. BADH (0.25 mg/ml) was incubated in buffer C at 30°C. The reaction was initiated by the addition of glutaraldehyde to a final concentration of 32 mM and was stopped by the addition of glycine to a final concentration of 450 mM. In order to assess the degree of cross-linking of the protein, the reaction was stopped several times, and samples were withdrawn, mixed with the appropriate amount of Laemmli sample buffer, and subjected to SDS-PAGE. To estimate the relative cross-linked and non-cross-linked protein contents of the samples, the relative color density of each band was determined with a laser-beam densitometer (GSXL; Pharmacia).

Amino acid composition and N-terminal sequence. After SDS-PAGE, proteins were electroblotted to Immobilon-P^{SO} essentially as described by Towbin et al. (50). Coomassie blue-stained protein bands were excised and submitted to the Biotechnology Resource Laboratory of the W.W. Keck Foundation, New Haven, Conn., for amino acid composition determination and N-terminal sequencing.

Protein absorption spectra. Absorbance spectra were measured on a Philips PU 8710 spectrophotometer at 30°C with 10-mm-path-length cuvettes. Immediately before use, the purified protein was desalted twice in buffer D by the method of Penefsky (38) to remove any oxidized DTT which could be present in the sample. The spectra were read with the buffer used for desalting as control.

Fluorescence measurements. Fluorescence measurements were carried out at 30°C on an LS50B luminescence spectrophotometer with a thermostated compartment (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.). Freshly desalted protein in buffer D was used. Fluorescence spectra were recorded with an excitation wavelength of 296 nm (2.5-nm bandwidth) and an emission wavelength of 300 to 400 nm (5-nm bandwidth). All solutions for fluorescence measurements were prepared with glass-distilled deionized water and filtered through 0.22- μ m-pore-size Millipore filters before use. To minimize the inner filter effects, we used a microcell with a 2-mm path length placed eccentrically in the cell compartment (8).

Preparation of antiserum. The 61-kDa protein band obtained after SDS-PAGE of fractions from the affinity chromatography step was excised from the gel and used as antigen. Rabbit antibodies were generated by a standard protocol consisting of subcutaneous injection with about 150 μ g of protein emulsified in an equal volume of Freund's adjuvant. After three booster injections with 100 μ g of the same antigen, the rabbit was bled and the serum was checked for the ability to cross-react with homologous antigen.

Analysis of the data. Data sets from the ultracentrifugation experiments were analyzed by using the nonlinear regression program NONLIN (21). The program fits to a reduced apparent molecular weight

$$\sigma = M(1 - v\rho)\omega^2/RT \quad (1)$$

where M is the molecular weight, v is the partial specific volume, ρ is the solvent density, ω is the radial velocity, R is the gas constant, and T is the absolute temperature (kelvin). The partial specific volume of BADH (0.7392 ml/g), was estimated from the amino acid composition by the method of Cohn and Edsall (10). The density of the buffer was computed to be 1.07725 g/ml.

Initial-velocity data were analyzed by nonlinear regression calculations with a commercial computing program formulated with the algorithm of Marquardt (29). Apparent K_m and V_{max} values were obtained by fitting the initial-velocity data to the Michaelis-Menten equation. When substrate inhibition was observed, the data were fitted to the equation

$$v = V_{max}[S](1 + \beta[S])/K_m + [S](1 + [S]/K_{si}) \quad (2)$$

where v is the experimentally determined initial velocity, V_{max} is the maximum velocity, $[S]$ is the concentration of the variable substrate, β is the interaction factor that describes the effect of substrate inhibition on V_{max} , K_m is the substrate inhibition constant, and K_{si} is the Michaelis-Menten constant for the substrate.

Data for the pH profile were fitted by using

$$A = C[1 + 10^{(pK_a - pH)} + 10^{(pH - pK_b)}] \quad (3)$$

where A is the enzyme activity observed as a function of pH, C is the pH-independent value of A , and K_1 and K_2 are macroscopic acid dissociation constants reflected on the acid side or on the basic side of the pH profile, respectively.

Thermal inactivation data were fit to a double exponential reaction

$$\%A_t = A_1e^{-k_1t} + A_2e^{-k_2t} + A_3 \quad (4)$$

where $\%A_t$ is the percentage of activity remaining at time t ; A_1 and A_2 are the percentages of activity lost in the fast and slow phases, respectively; k_1 and k_2 are the apparent first-order rate constants of the fast and slow phases, respectively; and A_3 is the percentage of activity remaining at equilibrium. Reactivation data were fitted to the same equation.

The experimental data for enzyme inactivation by dilution and in the absence of K^+ were fitted to the following equation, which is similar to equation 4 but represents the situation where, in the slow phase, the activity decayed not to a finite value but to zero:

$$\%A_t = A_1e^{-k_1t} + A_2e^{-k_2t} \quad (5)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Purification of BADH. Growth of *P. aeruginosa* on choline as the sole carbon and nitrogen source resulted in the induction of significant intracellular levels of BADH activity (around 1 U per mg of protein in the cell extract), which was completely absent in cells grown in the standard glucose medium. These results are in full agreement with the previous finding of induction of the enzyme by choline in *Pseudomonas* (35) and other bacteria (24, 34).

Our purification scheme contains major modifications compared with those reported previously by others (35, 42), which result in a marked increase in the final yield and specific activity of the purified enzyme and in a significant decrease in the overall time involved in the procedure. Enzyme may be purified from the starting material in only 2 days. A crucial step in the purification is the affinity chromatography on 2',5'-ADP-

TABLE 1. Purification of BADH from *P. aeruginosa*^a

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Sp act (U/mg of protein)	Purification (fold)	Yield (%)
Cell extract	172.0	178	1.0	1.0	100
Q-Sepharose Fast Flow	23.0	177	7.7	7.7	99
2',5'-ADP-Sepharose	0.8	117	146.3	146.3	66

^a Results are from a typical purification starting with 1.8 liters of bacterial culture in stationary phase.

Sepharose, which resulted in a 19-fold increase in the specific activity over that in the previous step, with a typical recovery of 66%. The choice of this particular affinity matrix was based on the higher affinity of the enzyme for $NADP^+$ than for NAD^+ . Preliminary attempts to purify BADH from *P. aeruginosa* by using the 5'-AMP-Sepharose affinity matrix, which has been successfully used in the purification of the NAD^+ -dependent BADHs from *E. coli* (14) and from the plant *Amaranthus hypochondriacus* (52), resulted in very poor yields and in an incomplete purification. Elution of the 2',5'-ADP-Sepharose with ADP or $NADP^+$ did not yield homogeneous enzyme. Complete purification of the enzyme was achieved by eluting the affinity column with a linear pH gradient as described in Materials and Methods. The purified enzyme was stable for up to 1 year when stored at -20°C in buffer D plus 5 mM DTT.

Results from a typical purification are summarized in Table 1. The modified procedure, described in this paper, for the purification of BADH from *P. aeruginosa* was reproducible and gave good yields of enzyme, with specific activities at 30°C of 156 and 74.5 U/mg of protein at pH 8.0 and 7.4, respectively. These values are considerably higher than those reported for BADH from human liver (9), leaves of plants (1, 52, 55), fungi (33), and *Bacillus subtilis* (3) but are similar to those for *X. translucens* (34) and *E. coli* (14) and lower than that for crab heart (12). In particular, the specific activity of BADH reported in this work is almost 100 times higher than that first reported for BADH from *P. aeruginosa* (35) but similar to that recently reported (42). Based on the initial BADH activity of the cell-free preparation and on the final specific activity of the pure enzyme, we conclude that BADH constitutes approximately 0.7% of the soluble protein in choline-grown cells at the stationary phase of growth. A similar result was obtained by Mori et al. (34) with the BADH from another member of the *Pseudomonadaceae*, *X. translucens*, which, like the enzyme from *Pseudomonas*, plays a catabolic role. The published purification procedure for the *X. translucens* enzyme (34) involved six steps and had a yield considerably lower than the one we report here for the purification of the enzyme from *P. aeruginosa*.

The preparations of BADH were homogeneous and contained a nontruncated, nonmodified enzyme as established by several criteria: (i) the elution profile from the 2',5'-ADP-Sepharose column revealed a single major and symmetrical protein peak with constant BADH specific activity (results not shown), (ii) the purified BADH gave a single sharp protein band with silver or Coomassie blue staining when analyzed under reducing conditions by SDS-PAGE and denaturing isoelectric focusing (Fig. 2A and B, lanes 2), and (iii) the estimated pI and molecular mass of the pure enzyme were identical to those found for the enzyme in cell extracts when subjected to isoelectric focusing (Fig. 2B) or to Western blot analysis (Fig. 2C). Taken together, these results show that the enzyme was not altered during the purification procedure either by chemical modification or by limited proteolysis.

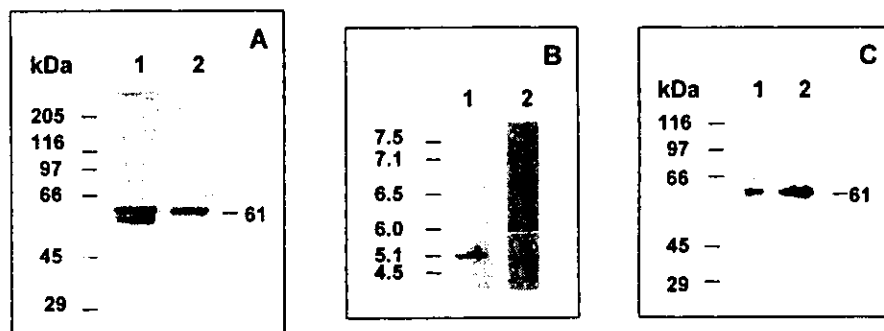


FIG. 2. Homogeneity and integrity of purified BADH from *P. aeruginosa*. (A) SDS-PAGE (8% gel) and silver staining of the purified BADH (0.44 μ g of protein). Lane 1, enzyme purified with β -mercaptoethanol in buffer and loaded after mixing with a sample buffer without a reducing agent. Lane 2, same as lane 1 but with 5 mM DTT in the sample buffer. The following proteins were used as M_r standards: rabbit muscle myosin (205,000), *E. coli* β -galactosidase (116,000), rabbit muscle phosphorylase *b* (97,400), bovine plasma albumin (66,000), ovalbumin (45,000), and bovine erythrocyte carbonic anhydrase (29,000). (B) Nondenaturing isoelectric focusing gel of BADH in cell extracts (22 μ g of protein) (lane 1) and denaturing isoelectric focusing gel of purified BADH (5.0 μ g of protein) in the presence of 8 M urea and 5 mM DTT (lane 2). Lane 1 was activity stained, and lane 2 was stained with Coomassie blue. The following proteins were used as pI standards: human hemoglobin C (7.5), human hemoglobin A (7.1), human carbonic anhydrase (6.5), bovine carbonic anhydrase (6.0), β -lactoglobulin B (5.1), and phycocyanin (4.5). The pIs of the standards are shown on the left. (C) Western blots of purified BADH (0.25 μ g of protein) (lane 1) and BADH in cell extracts from *P. aeruginosa* grown in choline (38 μ g of protein) (lane 2). Samples were subjected to SDS-PAGE (8% gel), transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with anti-*Pseudomonas* BADH antibody.

Physicochemical properties of the purified BADH. The subunit molecular mass estimated by SDS-PAGE was 61 ± 0.7 kDa (mean \pm standard error from five determinations) (Fig. 2B), a higher value than those reported for the subunits of BADH from *E. coli* (14) and *X. translucens* (34). When the enzyme was electrophoresed under denaturing conditions in the absence of β -mercaptoethanol in the sample buffer, protein bands with molecular masses higher than 61 kDa were not obtained, indicating the absence of any intersubunit disulfide linkage. However, intrasubunit disulfide bonds readily form, as demonstrated by the two additional protein bands with apparent molecular masses of 57.2 and 55.7 kDa observed when the SDS-PAGE was performed under nonreducing conditions (Fig. 2A, lane 1). The higher electrophoretic mobility of the intrachain-bonded product is most likely due to an incomplete unfolding of the protein by SDS, thereby altering its mobility.

Estimation of the molecular mass of the native BADH in potassium phosphate buffer, using both the pure enzyme and the enzyme in fresh cell extracts, by gel filtration chromatography resulted in an apparent molecular mass of 139 kDa. SDS-PAGE of the BADH eluted from the gel filtration column gave the same molecular mass of the subunit, 61 kDa, confirming that the enzyme was not degraded during the gel filtration process. In accordance with our data, Nagasawa et al. (35) estimated an apparent molecular mass for *P. aeruginosa* BADH of 145 kDa by using gel filtration chromatography on Sephadex G200. Unfortunately, those authors did not report any molecular mass for the subunits of this enzyme. Taking into account the subunit molecular mass of 61 kDa, which we found by SDS-PAGE, the estimated native molecular mass, 139 kDa, suggests a dimeric enzyme with identical subunits. Since the protein might migrate atypically upon SDS-PAGE or gel filtration, to investigate further the quaternary structure of *P. aeruginosa* BADH, we subjected the purified enzyme to chemical cross-linking with the bifunctional reagent glutaraldehyde (17), followed by SDS-PAGE, and to analytical ultracentrifugation.

As shown in Fig. 3A, two main bands were obtained in SDS-PAGE after treatment of the enzyme with glutaraldehyde. The first has the same mobility as found for the native enzyme (corresponding to 61 kDa), and the second has an

apparent molecular mass of 159 kDa, which is higher than that expected for the dimer. After prolonged incubation, a third band with a mobility corresponding to a molecular mass of 52 kDa appeared. The relative amount of the cross-linked species at different reaction times was estimated by densitometry (Fig. 3B). As expected, the amount of the monomeric, non-cross-linked subunit decreased steadily with increasing reaction time,

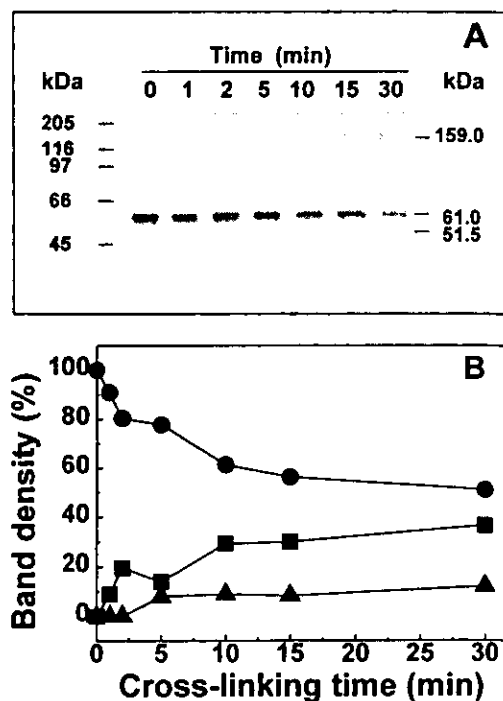


FIG. 3. Cross-linking of BADH from *P. aeruginosa*. (A) BADH (0.25 mg/ml) and 32 mM glutaraldehyde were incubated at 30°C in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 6.9) containing 0.1 mM EDTA, 20% (wt/vol) sucrose, and 25 mM KCl. The samples were analyzed by SDS-PAGE (8% gel) and silver staining. (B) Relative quantitation by densitometry of the non-cross-linked 61-kDa subunit (●), the cross-linked 159-kDa aggregate (■), and the cross-linked 52-kDa subunit (▲) bands.

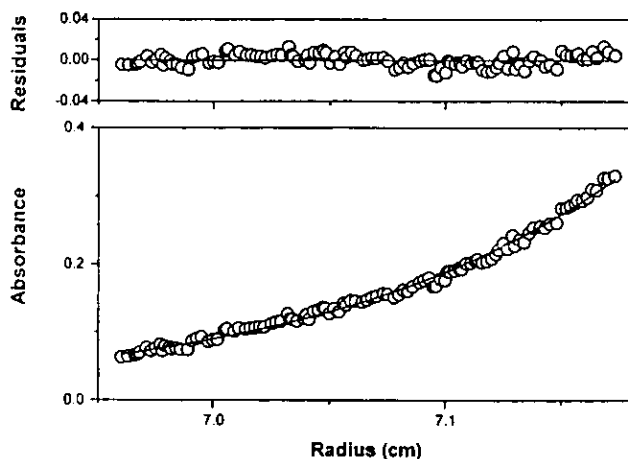


FIG. 4. Concentration distribution of BADH during sedimentation equilibrium. The circles are measured values in a standard two-sector ultracentrifuge cell. The solid line is the result of fitting the data with a single-ideal-species model by using the nonlinear regression program NONLIN and equation 1. The residuals to the fit are shown in the top panel.

while the amounts of the cross-linked aggregate and the cross-linked subunit increased with time. Since the composition of the cross-linked aggregates is an indication of the stability of specific enzyme aggregates present in solution and since we did not find any protein band corresponding to aggregates with a molecular mass lower or higher than 159 kDa, these data suggest that the dimer is the fundamental unit of aggregation of the enzyme. Inter- or intrasubunit cross-linking most likely produces alterations in the conformational structure either of the aggregates or of the subunit and therefore produces altered Stokes radii or molecular volumes, which result in bands moving slower or faster than expected.

The most accurate method of absolute molecular mass determination in solution is sedimentation equilibrium analysis in an analytical ultracentrifuge. Sedimentation equilibrium studies showed that native BADH is a dimeric protein. Nonideality was not observed, and the residuals revealed no systematic deviation (Fig. 4). The NONLIN program returned a σ value of 1.001 cm^2 . The molecular mass calculated by this method was $109,224 \pm 825$.

Taken together, the results of gel filtration, chemical cross-linking, analytical ultracentrifugation, and SDS-PAGE experiments suggest that BADH from *P. aeruginosa* is a homodimer. In this respect, it resembles the enzymes from *B. subtilis* (3) and plants (1, 52, 55) and differs from those from *X. translucens* (34), *E. coli* (14), fungi (33), and mammals (9), which are tetrameric.

The amino acid composition of the enzyme, estimated on the basis of a 61-kDa subunit, is shown in Table 2. Although the composition indicates variability for several residues compared with those known so far for BADH from bacterial sources, such as those of *E. coli* (23), *X. translucens* (34), *S. meliloti* (40), and *B. subtilis* (4), the enzymes are similar in overall percentages of acidic (including the corresponding amides), basic, hydrophobic, and aromatic residues (not shown).

Twenty of the first 21 amino acid residues of the enzyme were uniquely identified, indicating that the final product was a homogeneous protein preparation and that the enzyme subunits were of identical sequence. The following N-terminal sequence was found: AXFEEQKLYIGGRYVEASSGA. The second residue (designated X) could not be determined accurately. The comparison of this N-terminal sequence with those of

different BADH molecules revealed 65, 50, 30, and 25% identities with the BADHs from *X. translucens* (34), *E. coli* (5), *S. meliloti* (40), and *B. subtilis* (4), respectively. Lower identity with plant BADHs (18, 25, 31, 56, 57) and no identity with animal BADHs (20, 26) were found. Although we compared only the N-terminal regions, the results of this comparison suggest evolutionary relationships between the enzymes from bacteria and plants.

The UV and visible absorption spectra, from 200 to 400 nm, of native *P. aeruginosa* BADH at pH 6.9 and 30°C show only a single peak at 279.2 nm, with no absorption in the visible region (not shown). The A_{280}/A_{260} ratio was 1.95. Therefore, the enzyme neither is a flavoprotein nor contains bound NADP⁺ or NADPH. The extinction coefficient, $\epsilon_{280}^{1\%}$ (1-cm path length), was 10.82 ± 0.32 . This value represents the average from determinations with three different enzyme preparations.

Excitation of native BADH in phosphate buffer (pH 6.9) at 286 nm results in a single emission peak at about 332 nm (Fig. 5), which is characteristic of a class II tryptophan residue, i.e., of a partially exposed tryptophan residue at the surface of the protein (7). This fluorescence was 30% quenched in the presence of saturating concentrations of NADP⁺ (500 μM), while the emission maximum, λ_{max} , showed only a small red shift (2 nm). This quenching is most likely the result either of ring stacking of the indole ring of a tryptophan with the purine base of the nucleotide, in a manner similar to that which has been observed with nucleic acids (49), or of Förster energy transfer (16) from the tryptophan residues to the bound nucleotide. At pH 8.0 we found spectra similar to those at pH 6.9 (results not shown).

Antibody interaction. As shown in Fig. 2C, Western blotting with crude homogenates from bacteria grown in 20 mM choline as the only carbon and nitrogen source revealed a single protein band, indicating that the antibody is monospecific. No signals were visible with crude homogenates from bacteria grown in 11 mM glucose and 15 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, which is consistent with the absence of BADH activity in these homogenates. Neither BADH from *E. coli* cell extracts nor pure

TABLE 2. Amino acid content of BADH from *P. aeruginosa*

Amino acid	mol%	No. of residues per subunit ^a
Asx ^b	7.03	41
Thr	6.00	35
Ser	5.49	32
Glx ^b	13.21	77
Pro	4.63	27
Gly	10.46	61
Ala	12.00	70
Val	9.26	54
Met	1.89	11
Ileu	5.66	33
Leu	8.40	49
Tyr	2.92	17
Phe	3.95	23
Lys	2.74	16
His	0.86	5
Arg	4.46	26
Cys	1.03	6
Trp	ND ^c	ND
Total		583

^a Estimated by assuming a subunit molecular mass of 61 kDa.

^b The values include the corresponding amides.

^c ND, not determined.

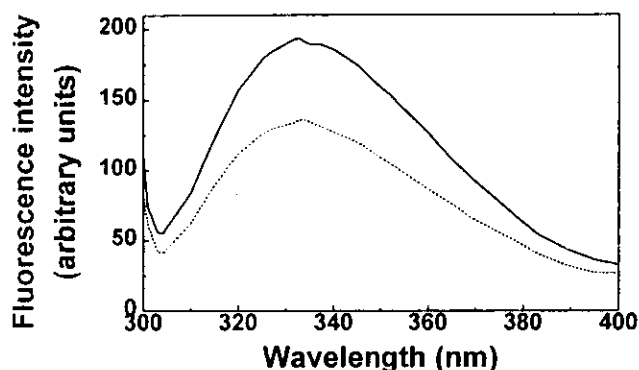


FIG. 5. Fluorescence emission spectra of BADH from *P. aeruginosa*. Fluorescence emission spectra in the absence (solid line) and presence (dashed line) of 0.5 mM NADP^+ are shown. The enzyme (164 $\mu\text{g/ml}$) was in potassium phosphate buffer (pH 6.9) containing 0.1 mM EDTA, 20% (wt/vol) sucrose, and 25 mM KCl.

enzyme from amaranth leaves interacted with the polyclonal anti-BADH from *P. aeruginosa*. In this experiment, care was taken to load a larger amount of whole protein in cell extracts from *E. coli* than in those from *P. aeruginosa*, considering the reported specific activities of the pure enzymes (reference 14 and this work).

Kinetic properties of the purified BADH. The following studies were carried out in order to compare the main kinetic features of the *P. aeruginosa* BADH purified by us with those of the previously purified enzyme (35) and BADHs from other sources. Similar to other BADHs (3, 14, 52), the *Pseudomonas* enzyme obeyed Michaelis-Menten kinetics for the two substrates and exhibited substrate inhibition by the aldehyde. At 30°C, pH 8.0, and 0.5 mM NADP^+ , the observed substrate inhibition was partial, as in the case of amaranth BADH (53). Fitting the experimental data to equation 2 gives an apparent K_i for betaine aldehyde of 4.6 ± 1.4 mM and a β value of 0.55 ± 0.02 . The enzyme showed a high degree of specificity at the binding site of the aldehyde, as previously suggested (35). We found that it could not catalyze the NADP^+ - or NAD^+ -dependent oxidation of other aldehydes, including those with a positive charge, such as γ -aminobutyraldehyde or 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde, which have been recently shown to be good substrates of mammalian (9) and plant (51, 54) BADHs. The former aldehyde was found, however, to be an efficient inhibitor of the oxidation of betaine aldehyde, indicating that it can bind to the active site with high affinity. Since in betaine aldehyde the length of the chain between the positive charge and the carbonyl group is two carbons and one carbon shorter than those in γ -aminobutyraldehyde and 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde, respectively, it is possible that the distance between the recognition subsites for the positive charge and the aldehyde function in the active site of *Pseudomonas* BADH imposes restrictions for the reaction to occur with aldehydes other than betaine aldehyde. The absence of reaction with γ -aminobutyraldehyde is consistent with the fact that *Pseudomonas* species possess an inducible NAD^+ -dependent aldehyde dehydrogenase specific for this aldehyde (19).

Regarding the nucleotide, we confirmed the previous report (35) indicating that the enzyme preferentially used NADP^+ over NAD^+ , although both nucleotides can be used. In this respect BADH from *Pseudomonas* resembles the enzyme from *X. translucens* (34), but it is different from all other BADHs studied to date, which prefer NAD^+ as the coenzyme (3, 9, 12, 14, 33, 52, 55). At 0.5 mM NADP^+ , 100 mM potassium phos-

phate buffer (pH 7.5), and 37°C, the apparent K_m for betaine aldehyde, estimated by using several concentrations of the aldehyde from 0.1 to 2.0 mM, was 453 ± 52 μM . The apparent K_m values for NADP^+ and NAD^+ , determined with the same buffer and also at 37°C by holding the concentration of betaine aldehyde at 1.0 mM and varying the concentration of NADP^+ in a range of 0.025 to 0.5 mM and that of NAD^+ in a range of 0.05 to 1 mM, were 62 ± 7 and 229 ± 5 μM , respectively. These apparent K_m values are in full agreement with those previously reported for the *Pseudomonas* BADH (35). The apparent V_{max} values, estimated at a fixed 1.0 mM betaine aldehyde concentration with NADP^+ or NAD^+ as the varied substrate, were 121 ± 4 and 133 ± 4 U/mg of protein, respectively. These values are similar to those reported for the enzyme from *X. translucens* (34) and are as much as 3- and 50-fold greater than those of purified BADHs from *E. coli* (14) and plants (1, 52, 55), respectively.

The effect of pH on the activity of purified BADH was measured under the standard assay conditions over the pH range of 6.0 to 9.5, in which we found that the enzyme is stable (not shown). Maximum enzyme activity was obtained at pH 8.0 in Tris-HCl buffer (results not shown). This behavior contrasts with that of amaranth BADH, which is inhibited by Tris (52), but is similar to that of the *B. subtilis* enzyme (3). In the phosphate-pyrophosphate buffering system, the enzyme showed an optimum pH of 8.0 to 8.5. Similar to the case for other BADHs (34, 35, 52), the velocity-versus-pH profile is a bell-shaped curve (Fig. 6A). Two macroscopic pK values, 7.0 ± 0.1 on the acidic side and 9.7 ± 0.1 on the basic side, were estimated from a fit of the experimental data to equation 3. Given that the ionizable groups of NADP^+ and betaine aldehyde have pKs different from those estimated in the experiments described above (11), it appears that the enzyme possesses two ionizable groups involved in catalysis and/or binding of substrates.

The energy of activation of the reaction was measured by performing enzyme assays at various temperatures in a range of 12 to 40°C under otherwise-standard conditions. The Arrhenius plot of the data (Fig. 6B) was linear, and the energy of enzyme activation calculated from the slope of this plot was 39.8 kJ mol^{-1} . This value is considerably lower (by 22 kJ mol^{-1}) than the activation energy of the amaranth enzyme (52), which is consistent with the much higher specific activity of the *P. aeruginosa* enzyme.

Stability of the purified BADH. The purified BADH (31 $\mu\text{g/ml}$) lost catalytic activity at 40°C in a biphasic inactivation process with an initial fast phase followed by a slower reaction (Fig. 7A). Eventually, an equilibrium between active and inactive forms is reached. A simple model consistent with these features of the thermal inactivation is $\text{A} \rightleftharpoons \text{I} \rightleftharpoons \text{I}'$, where A is the active form of the enzyme, which equilibrated fairly rapid with I, an inactive form. This then decays in an apparent reversible reaction to another inactive form of the enzyme, I'. For this model, the equation relating the change in concentration of A to time is equation 4, described in Materials and Methods. As can be seen, the fits of the experimental data to this equation are very good, giving apparent first-order rate constants of 0.142 ± 0.019 and 0.014 ± 0.007 min^{-1} for the fast and slow phases, respectively, and 28% of residual activity at equilibrium. Similar results were obtained with an enzyme 10-fold more concentrated (not shown). When the partially heat-inactivated enzyme is cooled to 30°C or lower, activity is regained in a time-dependent process, consisting of two clearly distinct phases, with apparent first-order rate constants of 0.106 ± 0.040 and 0.003 ± 0.001 min^{-1} . The presence of saturating concentrations of NADP^+ (500 μM) during incubation af-

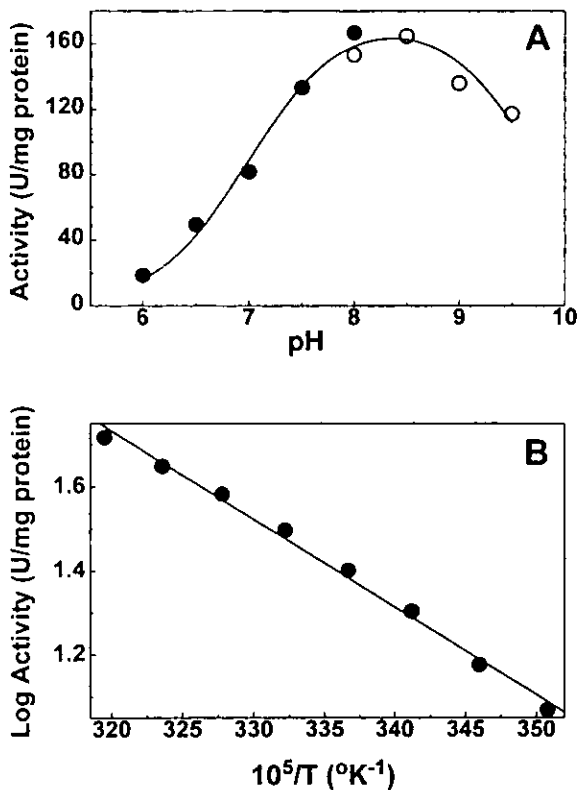


FIG. 6. Effect of pH and temperature on the activity of BADH from *P. aeruginosa*. (A) Profile of velocity versus pH. Enzyme (0.5 μ g/ml) activities were determined as described in Materials and Methods with 100 mM potassium phosphate (●) or 100 mM potassium pyrophosphate (○) buffer. The points are the experimentally determined values, and the line drawn through these points was calculated from the best fit of the data to equation 3. (B) Arrhenius plot of log of specific activity versus reciprocal of absolute temperature. The same amount of enzyme (2 μ g/ml) was assayed under the standard conditions in 100 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) at the different fixed temperatures without preincubation.

forded considerable protection against thermal inactivation (Fig. 7A). When added to the incubation medium of a partially inactivated enzyme, $NADP^+$ prevented further inactivation from occurring, but it did not reactivate the enzyme (results not shown).

As shown in Fig. 7B, the diluted enzyme (0.3 μ g/ml) slowly lost activity at pH 8.0 in 100 mM phosphate buffer. The experimental data were best fitted to equation 5, described in Materials and Methods. Therefore, the kinetics of the inactivation were consistent with a sequential three-state model like the one described above, although in this case the activity decayed not to a finite value but to zero, suggesting that the second, slow step is irreversible. The apparent first-order rate constants for the fast and slow phases were 0.95 ± 0.24 and 0.12 ± 0.06 min^{-1} , respectively, and the amplitude of the fast phase was 70.5%. At 3 μ g/ml after 9 h of incubation, the enzyme retained 76% of its original activity, which suggests that inactivation by dilution at a basic pH involves enzyme dissociation. At pH 6.5 the enzyme at 0.3 μ g/ml was stable for up to 9 h, which would seem to indicate that the protonization of some ionizable group(s) with a pK in the neutral range plays an important role in the maintenance of the native oligomeric structure of the enzyme. Both the rate constant and the amplitude of the fast phase were decreased in the presence of $NADP^+$, which seems to indicate that the nucleotide stabilizes the dimeric native form of the enzyme.

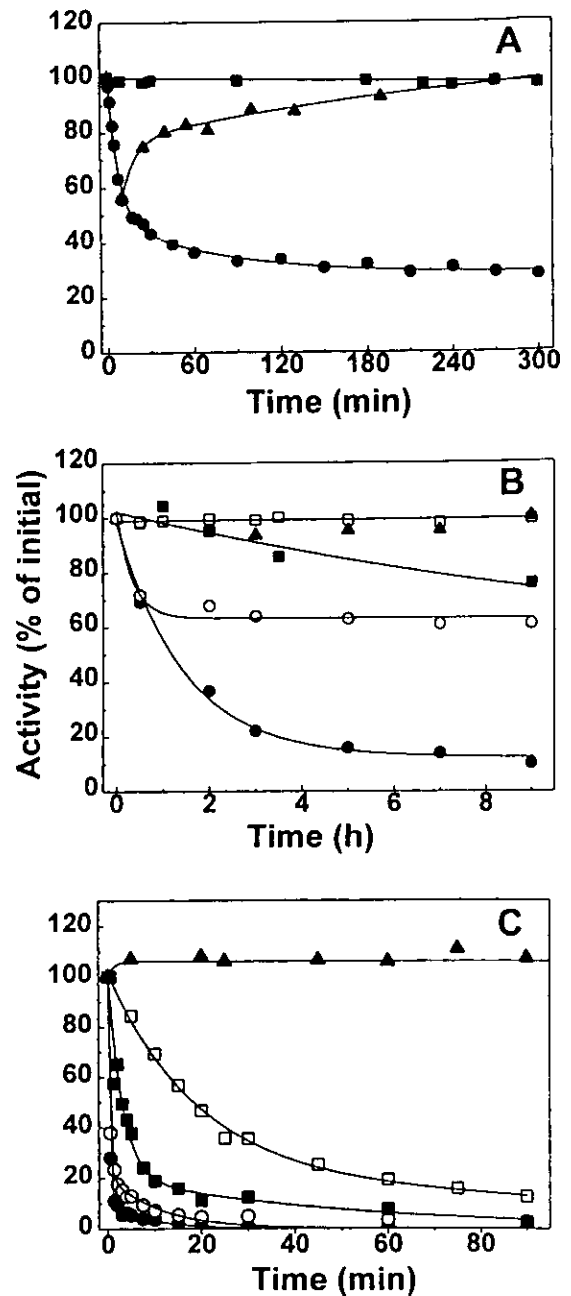


FIG. 7. Effect of temperature, dilution, and buffer composition on the stability of BADH from *P. aeruginosa*. (A) Kinetics of the reversible heat inactivation. The enzyme (31 μ g/ml) was incubated at 40°C in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) containing 0.1 mM EDTA, 5 mM β -mercaptoethanol, 20% (wt/vol) sucrose, and 25 mM KCl in the absence (●) or presence (■) of 0.5 mM $NADP^+$. After the times indicated, 4- μ l samples were withdrawn and immediately added to the standard assay mixture. Reactivation of the heated enzyme (▲) was achieved by cooling the partially inactivated enzyme at 30°C. (B) Kinetics of the inactivation by dilution. Enzyme was diluted to 0.3 (●, ○, and ▲) or 3 (■ and □) μ g/ml in 100 mM potassium phosphate buffer at pH 8.0 (●, ○, ■, and □) or pH 6.5 (▲) in the absence (●, ■, and ▲) or presence (○ and □) of 0.38 mM $NADP^+$. The enzyme was incubated at 30°C and assayed at various time points to determine the activity remaining, using the standard assay. (C) Kinetics of inactivation in the absence of K^+ ions. Enzyme (31 μ g/ml) was incubated at 30°C in 31 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) in the absence of KCl and $NADP^+$ (●) or in the presence of 25 mM KCl (○), 200 mM KCl (■), 0.5 mM $NADP^+$ (□), or 0.5 mM $NADP^+$ plus 25 mM KCl (▲) and was assayed at various time points to determine the activity remaining. In all panels the results are plotted as percentages of that for the untreated control. The lines are the results of the best fits of the experimental data to equation 4 (A) or to equation 5 (B and C).

To further study the conditions for the stabilization of the enzyme, we tested the effect of buffer composition. The enzyme (0.45 $\mu\text{g/ml}$) is highly unstable in Tris-HCl buffers, in a concentration range of 10 to 125 mM and a pH range of 7.0 to 9.0 (results not shown). The low stability of the BADH in Tris-HCl buffers has been previously observed for the enzymes from *E. coli* (14) and *X. translucens* (34), but no further characterization of this inactivation was performed; therefore, we found it of interest to study this property of the enzyme. We determined the kinetics of inactivation in 31 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) and found that, again, the inactivation involved two kinetically distinct processes, i.e., a rapid initial phase followed by a slower second phase (Fig. 7C). The experimental data were best fitted to equation 5, giving apparent first-order rate constants of 3.2 ± 0.12 and $0.15 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$ for the fast and slow phases, respectively, and an amplitude of the fast phase of 89%. An important difference in the inactivation by dilution is that the kinetics of inactivation were not affected by a 10-fold change in enzyme concentration (not shown). The inclusion of 5 mM DTT in the incubation medium did not affect the kinetics of inactivation (results not shown), ruling out a possible oxidation of an essential sulfhydryl group(s) which might be more exposed in Tris than in phosphate buffer. As in the cases of inactivation by heat and by dilution, inactivation in Tris buffers was greatly prevented by NADP⁺, but concentrations of the nucleotide of as high as 1 mM failed to give total protection (not shown). Partial protection against inactivation in Tris buffer was also afforded by KCl, but, as in the case of the nucleotide, we could not get total protection with any concentration of this ion. On the contrary, at KCl concentrations of above 500 mM, an increase in the inactivation rate was observed (not shown). NaCl at concentrations equimolar to those of KCl did not protect the enzyme, which indicates that the effect of KCl was not due either to Cl⁻ ions or to the increase in ionic strength of the incubation medium. Thus, K⁺ ions might play an important role in the stability of the enzyme, and inactivation in Tris-HCl buffer might be due to the absence of these ions. To test this possibility, the enzyme was preincubated in 125 mM sodium phosphate buffer under conditions otherwise identical to those described as above. Inactivation was also observed in the sodium phosphate buffer, although with a lower rate than in the Tris buffer (not shown), which indicates different effects of the phosphate and Tris ions on the stability of the enzyme. NADP⁺ and K⁺ have synergistic protective effects, and total protection was achieved by the presence of 0.5 mM NADP⁺ and 25 mM K⁺. Therefore, under our experimental conditions, both NADP⁺ and K⁺ are needed to stabilize the enzyme in Tris buffers. It is interesting that in phosphate buffers, K⁺ by itself afforded total protection (not shown). These findings suggest that *P. aeruginosa* BADH requires K⁺ ions for stability. No other known BADH has a requirement for K⁺ ions for stability, although those from *E. coli* (14), amaranth leaves (52), *B. subtilis* (3), and crab (12) are activated to some extent by these ions. Of all aldehyde dehydrogenases studied to date, only the mitochondrial isoenzyme of *Saccharomyces cerevisiae* is unstable in the absence of high concentrations of K⁺ (47). The role of K⁺ ions in the stability of the enzyme described in this paper would make BADH from *P. aeruginosa* a potential target for inhibition by nonessential monovalent cations and deserves further investigation.

In summary, BADH has been purified to homogeneity from the pathogen *P. aeruginosa* by a rapid and high-yield method, and some of its physicochemical and kinetic properties have been elucidated. It is hoped that the information presented here will facilitate the cloning and overexpression of the gene

encoding this enzyme, which would facilitate future works on rational drug design and screening. BADH from *Pseudomonas* has been shown to possess certain distinctive and unique properties, such as the requirement for K⁺ ions for stability. The enzyme is also highly specific for betaine aldehyde, unlike BADHs from other systems. Further studies will be oriented toward identifying additional differences between this enzyme and mammalian aldehyde dehydrogenases, which might be useful for the design of selective inhibitors.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant to R.A.M. from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-2552P-N).

We are grateful to A. D. Hanson (University of Florida, Gainesville) for the kind gift of 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde and to M. L. Vasil (University of Colorado, Denver) for kindly providing *P. aeruginosa* PAO1.

REFERENCES

1. Arakawa, K., T. Takabe, T. Sugiyama, and T. Akazawa. 1987. Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* 101:1485-1488.
2. Bernard, T., B. Perroud, J. A. Pocard, and D. Le Rudulier. 1986. Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch. Microbiol.* 143:359-364.
3. Boch, J., G. Nau-Wagner, S. Kneip, and E. Bremer. 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* 168:282-289.
4. Boch, J., B. Kempf, and E. Bremer. 1996. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.* 178:5121-5129.
5. Boyd, L. A., L. Adam, L. E. Pelcher, A. Mchughen, R. Hirji, and G. Selvaraj. 1991. Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDH's and a plant BADH. *Gene* 103:45-52.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-256.
7. Burstein, E. A., N. S. Vedenkina, and M. N. Irkova. 1973. Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem. Photobiol.* 18:263-279.
8. Chen, R. F., and J. E. Hayes, Jr. 1965. Fluorescence assay of high concentrations of DPNH and TPNH in a spectrophotofluorometer. *Anal. Biochem.* 1:523-529.
9. Chern, M. K., and R. Pietruszko. 1995. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213:561-568.
10. Cohn, E. J., and E. T. Edsall. 1943. *Proteins, amino acids, and peptides as ions and dipolar ions*, p. 374-377. Reinhold Publishing Co., New York, N.Y.
11. Dawson, R. M. C., D. C. Elliot, W. H. Elliot, and K. M. Jones. 1986. *Data for biochemical research*, 3rd ed., p. 11130. Clarendon Press, Oxford, United Kingdom.
12. Dragolovich, J., and S. K. Pierce. 1994. Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *J. Exp. Zool.* 270:417-425.
13. D'Souza-Ault, M. R., L. T. Smith, and G. M. Smith. 1993. Roles of *N*-acetylglutaminyl-glutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:473-478.
14. Falkenberg, P., and A. R. Stroem. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034:253-259.
15. Flores, H. E., and P. Filner. 1985. Polyamine catabolism in higher plants. characterization of pyrroline dehydrogenase. *Plant Growth Regul.* 3:277-291.
16. Förster, T. 1948. Intermolecular energy transference and fluorescence. *Ann. Phys. (Leipzig)* 2:55-75.
17. Habeeb, A. F. S. A., and R. Hiramoto. 1968. Reaction of protein with glutaraldehyde. *Arch. Biochem. Biophys.* 126:16-26.
18. Ishitani, M., T. Nakamura, S. Y. Han, and T. Takabe. 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. *Plant Mol. Biol.* 27:307-315.
19. Jakoby, W. B., and J. Fredericks. 1959. Pyrrolidine and putrescine metabolism: γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 234:2145-2150.
20. Johansson, K., M. El-Ahmad, S. Ramaswamy, L. Hjelmqvist, H. Jörnvall, and H. Eklund. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* 7:2106-2117.
21. Johnson, M. L., J. J. Correia, D. A. Yphanthis, and H. R. Halvorson. 1981.

- Analysis of data from the analytical ultracentrifuge by nonlinear least-squares techniques. *Biophys. J.* 36:575-578.
22. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
 23. Lamarck, T., E. Kaasen, M. W. Eshoo, P. Falkenberg, J. McDougall, and A. R. Stroem. 1991. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5:1049-1064.
 24. Landalf, B., and A. R. Stroem. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 165:849-855.
 25. Legaria, J., R. Rajsbaum, R. A. Muñoz-Clares, N. Villegas-Sepúlveda, J. Simpson, and G. Iturriaga. 1998. Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene* 218:69-76.
 26. Lin, S. W., J. C. Chen, L. C. Hsu, C. Hsieh, and A. Yoshida. 1996. Human gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34:376-380.
 27. Lisa, T. A., C. H. Casale, and C. E. Domenech. 1994. Cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high-phosphate medium. *Curr. Microbiol.* 28:71-76.
 28. Lucchesi, G. I., T. A. Lisa, and C. E. Domenech. 1989. Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium. *FEMS Lett.* 57:335-338.
 29. Marquardt, D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11:431-441.
 30. Matthews, L. W. S., J. L. Spector, J. Lemm, and J. L. Potter. 1963. Studies on pulmonary secretions. I. The over-all chemical composition of pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, bronchiectasis, and laryngectomy. *Am. Rev. Respir. Dis.* 88:199-204.
 31. McCue, K. F., and A. D. Hanson. 1992. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* 18:1-11.
 32. Miller, J. H. 1977. Experiments in molecular genetics, 3rd ed., p. 431-435. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
 33. Mori, N., B. Kawakami, K. Hyakutome, Y. Tani, and H. Yamada. 1980. Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpon didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* 40:3015-3016.
 34. Mori, N., N. Yoshida, and Y. Kitamoto. 1992. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferment. Bioeng.* 73:352-356.
 35. Nagasawa, T., Y. Kawabata, Y. Tani, and K. Ogata. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agric. Biol. Chem.* 40:1743-1749.
 36. Oakley, B. R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105:361-363.
 37. Ostroff, R. M., B. Wretling, and M. L. Vasil. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 172:5915-5923.
 38. Penefsky, H. S. 1977. Reversible binding of Pi by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.* 252:2891-2899.
 39. Pesin, S. R., and O. A. Candia. 1982. Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22:651-659.
 40. Pocard, J. A., N. Vincent, E. Boncompagni, L. T. Smith, M. C. Poggi, and D. Le Rudulier. 1997. Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Synorizobium melliloti* 102F34. *Microbiology* 143:1369-1379.
 41. Rennick, B. R. 1981. Renal tubule transport of organic ions. *Am. J. Physiol.* 240:F83-F89.
 42. Russell, R., and R. K. Scopes. 1994. Use of hydrophobic chromatography for purification of the membrane-located choline dehydrogenase from a *Pseudomonas* strain. *Bioseparation* 4:279-284.
 43. Sage, A. E., A. I. Vasil, and M. L. Vasil. 1997. Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 23:43-56.
 44. Scopes, R. K. 1974. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal. Biochem.* 59:277-282.
 45. Shortridge, V. D., A. Lazdunski, and M. L. Vasil. 1992. Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 6:863-871.
 46. Smith, L. T., J. A. Pocard, T. Bernard, and D. Le Rudulier. 1988. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 170:3142-3149.
 47. Sorger, G. J., and H. J. Evans. 1966. Effects of univalent cations on the properties of yeast NAD⁺ acetaldehyde dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 118:1-8.
 48. Thurston, C. F., and L. F. Henley. 1988. Isoelectric focusing under denaturing conditions, p. 257-267. In J. M. Walker (ed.), *Methods in molecular biology: new protein techniques*. The Humana Press Inc., Clifton, N.J.
 49. Toulmé, J. J., and C. Hélène. 1977. Specific recognition of single-stranded nucleic acids. *J. Biol. Chem.* 252:244-249.
 50. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
 51. Trossat, C., B. Rathinasabapathi, and A. D. Hanson. 1997. Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyzes oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and omega-aminualdehydes. *Plant Physiol. (Rockville)* 113:1457-1461.
 52. Valenzuela-Soto, E. M., and R. A. Muñoz-Clares. 1994. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* 143:145-152.
 53. Vojtechová, M., R. Rodríguez-Sotres, E. M. Valenzuela-Soto, and R. A. Muñoz-Clares. 1997. Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *Biochim. Biophys. Acta* 1341:49-57.
 54. Vojtechová, M., A. D. Hanson, and R. A. Muñoz-Clares. 1997. Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* 337:81-88.
 55. Weretilnyk, E. A., and A. D. Hanson. 1989. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves. Purification, in vitro translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* 271:56-63.
 56. Weretilnyk, E. A., and A. D. Hanson. 1990. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2745-2749.
 57. Wood, A. J., H. Saneoka, D. Rhodes, R. J. Joly, and P. B. Goldsbrough. 1996. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum: molecular cloning and expression of two related genes. *Plant Physiol.* 110:1301-1308.
 58. Wright, J. R., and J. A. Clements. 1987. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136:426-444.

VI.2. Artículo II.

“Steady-State Kinetic Mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺- Dependent Reactions Catalysed by Betaine Aldehyde Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*”

Enviado para su publicación a Biochemical Journal

**Steady-State Kinetic Mechanism of the NADP⁻- and NAD⁺-
Dependent Reactions Catalysed by Betaine Aldehyde
Dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa***

Roberto VELASCO-GARCÍA*, Lilian GONZÁLEZ-SEGURA† and Rosario A. MUÑOZ-CLARES*†

*Laboratorio de Osmorregulación, ENEP Iztacala and †Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México.

†To whom correspondence should be addressed: Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, 04510 Mexico D.F., Mexico. Tel: + 52-56225276; Fax : + 52-56225329; E-mail: clares@servidor.unam.mx

Short title: Betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*

Abbreviations used: BADH, betaine aldehyde dehydrogenase; BA, betaine aldehyde; Hepes, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2ethanesulfonic acid;

SYNOPSIS

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) catalyses the irreversible oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine with the concomitant reduction of NAD(P)^+ to NADP(H) . In *Pseudomonas aeruginosa* this reaction is an obliged step in the assimilation of carbon and nitrogen when bacteria are growing in choline or choline precursors. The kinetic mechanisms of the NAD^+ - and NADP^+ -dependent reactions were examined by steady-state kinetic methods, and by dinucleotide binding experiments. The double-reciprocal patterns obtained for initial velocity using NAD(P)^+ , and for product and dead-end inhibition establish that both mechanisms are steady-state random. However, quantitative analysis of the inhibitions, and comparison with binding data, suggest a preferred route of addition of substrates and release of products where NAD(P)^+ binds first and NAD(P)H leaves last, particularly in the NADP^+ -dependent reaction. Abortive binding of the dinucleotides, or their analogue ADP, in the betaine aldehyde site was inferred from total substrate inhibition by the dinucleotides, and parabolic inhibition by NADH and ADP. A weak partial, uncompetitive substrate inhibition by the aldehyde was only observed in the NADP^+ -dependent reaction. The kinetics of *P. aeruginosa* BADH are very similar to those of glucose-6-phosphate dehydrogenase, suggesting that both enzymes fulfil a similar amphibolic metabolic role when the bacteria grow in choline or in glucose, respectively.

INTRODUCTION

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, E. C. 1.2.1.8) catalyses the irreversible oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine with the concomitant reduction of NAD(P)⁺ to NADP(H). This reaction is the final step in the biosynthesis of the osmoprotectant glycine betaine from choline [1] that takes place in response to osmotic stress in a wide variety of organisms [2-7]. In certain bacteria, as *Escherichia coli*, glycine betaine is a nonmetabolizable osmolite [7]. In contrast, in micro-organisms such as *Pseudomonas aeruginosa* [8], *Xanthomonas translucens* [9], and *Sinorhizobium meliloti* [10,11], which are able to catabolise glycine betaine, the BADH reaction is an obligated step in the catabolism of choline or choline precursors, such as phosphatidylcholine, phosphorylcholine, acetylcholine or choline. It is interesting that these precursors are very abundant in the infection sites of *P. aeruginosa* [12-16]. Osmotic stress conditions are also frequently present in these sites [17], and it is known that *P. aeruginosa* is able to grow under osmotic stress in the presence of the osmoprotectant glycine betaine or glycine betaine precursors [12,13]. The virulence of *P. aeruginosa* have been related to the ability to adapt to osmotic stress [18] and to the expression of phospholipase C [19], the first enzyme in the metabolic pathway of phosphatidylcholine to glycine betaine. Therefore, BADH activity seems to be crucial for bacterial growth under the conditions of infection, i.e. osmotic stress plus abundance of choline or choline precursors, and, consequently, to be a suitable target for antimicrobial agents. Inhibition of this enzymatic activity not only would starve the bacteria grown in choline or choline precursors, and/or seriously affect its ability to stand osmotic stress, but it also would stop growth, even if glycine betaine is

present, due to the toxic effect of the build-up of betaine aldehyde, as Sage et al. [20] have recently found in a *P. aeruginosa* mutant deficient in BADH activity.

Most of the BADHs studied to date show a marked preference for NAD⁺ over NADP⁺ [3,5,21-25], with the exception of the catabolic BADH from *P. aeruginosa* [8,26] and *X. translucens* [9], which can use NADP⁺ and NAD⁺ as coenzymes. Therefore, it is likely that when the opportunistic human pathogen *P. aeruginosa* grows in choline or choline precursors as the only carbon, nitrogen and energy source, BADH behaves as a dual dehydrogenase, serving either catabolic or anabolic roles depending on whether it uses NAD⁺ or NADP⁺.

The kinetic studies on the *Pseudomonas* BADH are scarce and the kinetic mechanism of this important enzyme has not been elucidated to date. The kinetic mechanisms of the BADH from the fungus *Cylindrocarpon didymum* [21] and from *E. coli* [22] have been reported to be ping-pong, and those of the enzyme from the plant *Amaranthus hypochondriacus* [27] and porcine kidney [25] are ordered bi bi steady-state. Since a complete knowledge of the kinetic mechanism of *P. aeruginosa* BADH is important to further the understanding of the role that the enzyme may play in the metabolism of choline and choline precursors in this important pathogen, and for future efforts on specific inhibitor design, we undertook the detailed characterisation of the steady-state kinetics of the NADP⁺ and NAD⁺-dependent reactions catalysed by BADH from *P. aeruginosa*. We report here a steady-state fully random kinetic mechanism with a preferred route of addition of substrates and release of products in which the oxidized dinucleotide binds first and the reduced dinucleotide leaves last. The *P. aeruginosa* BADH kinetics are fully compatible with an amphibolic metabolic role for this enzyme.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and biochemicals

Betaine aldehyde chloride, glycine betaine (free base), choline chloride, NAD(P)⁺, NADPH, DTT, S-NAD(P)⁺, Tris, β-mercaptoethanol were obtained from Sigma (St. Louis, MO). All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Enzyme purification and assay

BADH was purified to homogeneity from *P. aeruginosa* PAO1 strain as previously described [26]. The enzyme does not contain NAD(P)⁺ or NAD(P)H bound as judged by the A_{280}/A_{260} ratio, which was 1.95. The specific activity of the enzyme preparation used, determined in a standard assay in the presence of 1.0 mM betaine aldehyde and 0.3 mM NADP⁺ in a 100 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0, at 30 °C, was 79 units/mg protein. One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyses the formation of μmol of NAD(P)H per min in our standard assay.

Kinetic studies

Steady-state initial velocity studies were performed 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 1 mM EDTA at the concentrations of substrates and products stated in each experiment. The production of NAD(P)H was monitored spectrophotometrically at 340 nm ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using a Philips PU 8710 spectrophotometer equipped with a kinetics software package. All assays were initiated by addition of the enzyme (3.7 nM). Initial steady-state rates were determined from the initial, linear portions of reaction progress curves. Each point shown in the figures is the average of duplicate or triplicate determinations. In all the

experiments the reported aldehyde concentrations represent the sum of the free and hydrated species present. Initial velocity patterns in the absence of added inhibitors were obtained by varying the concentration of the dinucleotide at several fixed levels of betaine aldehyde using the assay described above. Dead-end inhibition patterns were obtained by varying one reactant with the second fixed at a near K_m value and at different fixed levels of the inhibitor. Kinetic data were analysed by non-linear regression calculations using a commercial computing program formulated with the algorithm of Marquardt [28]. Initial velocity data in the absence of products or dead-end inhibitors at several concentrations of the fixed substrate were first individually fitted to the Michaelis-Menten equation [eqn. (1)]:

$$v = V[S]/(K_m + [S]) \quad (1)$$

where v is the experimentally determined initial velocity; V is the maximal velocity; $[S]$ is the concentration of the variable substrate; and K_m is the concentration of substrate at half-maximal velocity. On the basis of the corresponding double reciprocal plots, the mechanism was identified, and the data set was globally fit to the initial velocity equation for a sequential mechanism [eqn. (2)]:

$$v = V[A][B]/(K_{ia}K_b + K_b[A] + K_a[B] + [A][B]) \quad (2)$$

where A is NAD(P)⁺ and B is betaine aldehyde; K_a and K_b are the Michaelis-Menten constants for NAD(P)⁺ and betaine aldehyde, respectively, and K_{ia} is the dissociation constant of E-NAD(P)⁺ (nomenclature of Cleland [29]). The analogous constant K_{ib} from dissociation of betaine aldehyde from E-betaine aldehyde was estimated considering that A

is betaine aldehyde and B is NAD(P)⁺, or from eqn. (3), assuming rapid equilibrium conditions:

$$K_{ia}K_b = K_aK_{ib} \quad (3)$$

Initial velocity data for product, dead-end and substrate inhibition were first plotted as double reciprocal plots. The form of inhibition was graphically determined by replots of intercepts and slopes. The data were globally fitted to eqns. (4), or (5), corresponding to linear competitive or mixed inhibition, respectively, or to eqns. (6) or (7), corresponding to S-parabolic I-linear mixed, or parabolic mixed inhibition, respectively,

$$v = V[S]/(K_m(1 + [I]/K_{ic}) + [S]) \quad (4)$$

$$v = V[S]/\{K_m(1 + [I]/K_{ic}) + [S](1 + [I]/K_{iu})\} \quad (5)$$

$$v = V[S]/\{K_m(1 + [I]/K_{ic} + [I]^2/K_{ic}K_{ic}') + [S](1 + [I]/K_{iu})\} \quad (6)$$

$$v = V[S]/\{K_m(1 + [I]/K_{ic} + [I]^2/K_{ic}K_{ic}') + [S](1 + [I]/K_{iu} + [I]^2/K_{iu}K_{iu}')\} \quad (7)$$

In these equations K_{ic} and K_{iu} are competitive and uncompetitive inhibition constants, respectively of the first molecule of inhibitor bound to the enzyme, and K_{ic}' and K_{iu}' are the competitive and uncompetitive inhibition constants, respectively, of the second molecule of inhibitor. All other terms are as defined above. In the case of mixed inhibition the differences between K_{ic} and K_{iu} were always less than 10-fold and more than 1.5. If this difference was less than 1.5 fold the equation for non-competitive inhibition ($K_i = K_{ic} = K_{iu}$) was used.

Eqn. (8) or eqn. (9) were used for total or partial substrate inhibition, respectively

$$v = V[S]/\{K_m + [S](1 + [S]/K_{is})\} \quad (8)$$

$$v = V[S](1 + \beta[S]/K_{is})/\{K_m + [S](1 + [S]/K_{is})\} \quad (9)$$

were K_{IS} is the substrate inhibition constant, and β is the interaction factor that describe the effect of substrate inhibition on V .

The points in the figures are the experimentally determined values, while the curves are calculated from fits of these data to the appropriate equation. The best fits were determined by the relative fit error, error of the constants, and absence of significant correlation between the residuals and other relevant variables like observed velocities, substrate concentration, and data number.

Equilibrium dissociation constants of NAD(P)⁺

Dissociation constants for the interaction of dinucleotides with enzyme were determined by following the quenching of intrinsic protein fluorescence. The measurements were performed at 30 °C on a LS50B luminescence spectrophotometer with a thermostated compartment (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Freshly desalted protein, in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0), containing 10 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 20% (w/v) sucrose, and 25 mM KCl, was excited at 296 nm (5 nm bandwidth) and the emission was recorded at 333 nm (10 nm bandwidth). The enzyme concentration was 0.8 μ M, which is low enough to avoid inner filter effects of the protein. In addition, to minimise the inner filter effects of the dinucleotides we used a micro-cell of 5 mm of path length placed eccentrically in the cell compartment [30]. Inner filter effects caused by NAD(P)⁺ at 296 and 333 nm were corrected by the formula [31]:

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

where F_c is the corrected intensity, F_{obs} is the measured intensity, and A_{ex} and A_{em} are the absorbances at the excitation and emission wavelengths, respectively. NAD(P)⁺ titrations

were performed by adding sequentially aliquots of stock solutions of the dinucleotides to a single sample of BADH in a fluorescence cuvette. The solutions were equilibrated for 2 min after each addition prior to reading the fluorescence. The fluorescence data were corrected for background fluorescence, for dilution of the sample, and for inner filter effects. The corrected fluorescence intensities were used to calculate the dissociation constant of the dinucleotides by fitting the data to eqn. (11):

$$\Delta F = \Delta F_{\max} [\text{NAD(P)}^+]_{\text{free}} / (K_d + [\text{NAD(P)}^+]_{\text{free}}) \quad (11)$$

where ΔF is the difference in fluorescence intensity of protein in the absence and presence of the dinucleotides, ΔF_{\max} is this difference when all the binding sites of the enzyme are saturated with ligand, and K_d is the dissociation constant of NAD(P)^+ from the complexes E-NAD(P)^+ . The free ligand concentration was estimated using $[\text{ligand}]_{\text{free}} = [\text{ligand}]_t - n[\text{E}]_t$, in which $[\text{ligand}]_t$ and $[\text{E}]_t$ represent the total ligand and free enzyme concentrations, respectively, and n is the number of ligand binding sites on the enzyme ($n = 1$ for monomer concentration). The data were expressed as percentage of the initial fluorescence.

RESULTS

Initial velocity patterns

The NADP^+ - and NAD^+ -dependent oxidation of betaine aldehyde followed hyperbolic saturation curves and gave linear double-reciprocal plots, in the range 100-1000 μM betaine aldehyde and 25-500 μM NAD(P)^+ (Figure 1). The families of lines obtained intersect to the left of the $1/v$ axis indicating a sequential kinetic mechanism. Data for the NADP^+ -dependent reaction gave a good global fit to the equation for an ordered or rapid-

equilibrium random bi bi mechanism, eqn. (2) (Figure 1A), whereas data for the NAD⁺-dependent reaction gave a poorer fit as indicated by a clear deviation of the experimental points corresponding to the lowest NAD⁺ concentrations from the theoretical line derived from the fit (Figure 1B, solid lines). In fact, when data in each line of Fig 1B are individually fitted by linear regression (Figure 1B, dashed lines) it is clear that they do not intersect in a common point. These results suggest some degree of randomness [27] in the NAD⁺-dependent reaction. The kinetic parameters estimated for both reactions by global fit of the initial velocity data to eqn. (2) are given in Table 1. K_i values for the dinucleotide or betaine aldehyde were estimated considering that the dinucleotide or the aldehyde combine first with the enzyme, or assuming a rapid equilibrium random mechanism. The k_{cat} value was estimated assuming that the enzyme is a homodimer of 109 kDa with two active sites [26].

Product inhibition patterns

To further test the kinetic mechanism, we performed inhibition studies with both products of the reaction, the reduced dinucleotides and glycine betaine. At fixed subsaturating concentration of betaine aldehyde, 0.5 mM, the inhibition by NADPH was linear competitive with respect to NADP⁺. With betaine aldehyde as the variable substrate, at a fixed subsaturating concentration of NADP⁺, 100 μ M, NADPH was a linear mixed type inhibitor. Inhibition by NADH was more complex. Data in the inhibition pattern against NAD⁺ are best fitted to eqn. (6), corresponding to S-parabolic I-linear non-competitive inhibition (Figure 2A), whereas those in the inhibition pattern against betaine aldehyde

were best fitted to eqn. (7), corresponding to parabolic non-competitive inhibition, in which both slopes and intersects are parabolic function of the concentration of the inhibitor (Figure 2B). The patterns of inhibition and inhibition constants estimated for the reduced dinucleotides are given in Table 2.

The acid product of the reaction, glycine betaine, was a very poor inhibitor. Significant inhibition was only observed at very high concentrations, 50 mM and above. Glycine betaine in a concentration range of 50 to 200 mM behaved as a linear mixed or noncompetitive inhibitor with respect to either dinucleotide or betaine aldehyde. It is interesting that the estimated inhibition constants for the acid product are three order of magnitude greater than those for the other reaction product, the reduced dinucleotide (Table 2).

Dead-end inhibition patterns

The use of dead-end inhibitors is a powerful tool to determine or confirm a kinetic mechanism [32]. In this study we use ADP as a dead-end analogue of the dinucleotides, and choline and benzaldehyde as dead-end analogues of betaine aldehyde. The use of benzaldehyde as a dead-end inhibitor was justified by initial velocity studies that showed it is not a substrate of the *P. aeruginosa* BADH. Results of the dead-end inhibition studies are summarized in Table 3.

With NADP⁺ as the variable substrate at a fixed subsaturating concentration of betaine aldehyde, 500 μM, ADP, in a concentration range from 1.25 to 3.75 mM, gave a linear competitive inhibition pattern, whereas with NAD⁺ gave a S-parabolic I-linear non-

competitive inhibition pattern. However, parabolic inhibition of ADP was also observed in the NADP⁺-dependent reaction when a wider concentration range of the inhibitor, from 1 to 15 mM, was tested (Figure 3). Interestingly, the Dixon plots of 1/*v* versus ADP concentration become almost linear at high betaine aldehyde concentration in both the NAD⁺ and NADP⁺-dependent reactions, suggesting that binding of the second molecule of the nucleotide is competitive with the aldehyde. With respect to betaine aldehyde, ADP behaved as a non-competitive inhibitor in the NADP⁺-dependent reaction, and as a mixed inhibitor in the NAD⁺-dependent reaction. This inhibition by ADP was slope-parabolic in both cases, whereas it was intercept-linear in the NADP⁺-dependent reaction and intercept-parabolic in the NAD⁺-dependent (Table 3).

Choline yielded linear mixed inhibition against NADP⁺ and NAD⁺, and linear competitive inhibition against betaine aldehyde. Benzaldehyde was only tested in the NADP⁺-dependent reaction, and its inhibition pattern versus NADP⁺ was qualitatively similar to that of choline. Quantitatively, benzaldehyde is a much more effective inhibitor than choline, as indicated for their respective *K_i* values, given in Table 3. This result indicates the importance of the aldehyde group for substrate binding.

Substrate inhibition

In both the NAD⁺- and NADP⁺-dependent reactions, substrate inhibition by the dinucleotide was observed (Figure 4A). At 0.2 mM betaine aldehyde the substrate inhibition constants for NAD⁺ and NADP⁺, estimated from a fit of the data to eqn. (8), were 49.7 ± 7.7 and 16.1 ± 1.8 mM, respectively. To gain insight into the mechanism of this inhibition, we carried

out initial velocity experiments in which the concentration of betaine aldehyde was varied in a range from 0.1 to 1 mM, at several fixed, high NADP⁺ concentrations, which are saturating in its role as substrate (from 1 to 10 mM). We found a total mixed inhibition of NADP⁺ with respect to betaine aldehyde (Figure 4B), with a K_{ic} value of 12.3 ± 1.3 mM and a K_{iu} value of 48.0 ± 10.8 mM.

As we previously reported [26] the NADP⁺-dependent reaction catalysed by BADH from *P. aeruginosa* is partially inhibited by high concentrations of the aldehyde substrate. Substrate inhibition by the aldehyde is very weak, what makes difficult the establishment of the mechanism. The pattern of inhibition of betaine aldehyde versus NADP⁺ appears to be consistent with uncompetitive partial inhibition. We did not observe inhibition by betaine aldehyde in the NAD⁺-dependent reaction, even when the aldehyde was raised up to 60 mM.

Dissociation constant of enzyme-NAD(P)⁺ complexes

The binding of NAD(P)⁺ quenches the intrinsic protein fluorescence of the enzyme [26]. The value of the dissociation constant (K_d) for NAD(P)⁺ binding can be determined from the dependence of fluorescence intensity upon dinucleotide concentration. Both nucleotides seem to induce similar conformational changes upon binding to the enzyme, although binding of NAD⁺ produces a greater quenching response in the enzyme fluorescence than NADP⁺. Thus, the maximum fluorescence change caused by NAD⁺ was 38% whereas NADP⁺ caused a 26%. The binding curves were hyperbolic (Figure 5) and the data gave a

good fit to eqn. (11) with K_d values of $45.3 \pm 3.1 \mu\text{M}$ and $85.4 \pm 2.4 \mu\text{M}$ for NADP^+ and NAD^+ , respectively.

DISCUSSION

Kinetic mechanism

BADH catalyses an irreversible reaction and therefore kinetic analysis is limited to initial velocity studies of the forward reaction in the absence and presence of inhibitors. Neither the reverse reaction nor isotopic exchange between products and substrates can be demonstrated. Moreover, the accuracy of the kinetic parameters cannot be tested by the Haldane relationships.

The initial velocity patterns obtained in the NADP^+ -dependent reaction are consistent with a sequential mechanism either steady-state ordered or rapid equilibrium random [29]. In the NAD^+ -dependent reaction these patterns suggest some degree of randomness. Product inhibition patterns by NADPH versus NADP^+ and by NADH versus NAD^+ are competitive and S-parabolic non-competitive, respectively, indicating differences in the kinetic mechanism between both reactions. However, patterns of inhibition by the acid product of the reaction, glycine betaine, were similar in both reactions, mixed or non-competitive with respect to the dinucleotides, either NADP^+ or NAD^+ , and to the aldehyde. The glycine betaine inhibition patterns are suggestive of steady-state mechanisms with random release of products and ruled out ordered mechanisms. This is because in an ordered mechanism in which NAD(P)^+ add first to the enzyme and NAD(P)H are released

last, glycine betaine would be an uncompetitive inhibitor versus both dinucleotides and versus betaine aldehyde, given the irreversibility of the BADH catalysed reaction. If, on the contrary, betaine aldehyde were the first substrate and glycine betaine the last product, the acid should be competitive against the aldehyde and noncompetitive against the dinucleotide. Neither of these patterns were found. Therefore, to account for the inhibition patterns observed, the acid should add to both the free enzyme and the E-NAD(P)H complexes, as concluded above. Glycine betaine, at the very high concentrations required to inhibit the enzyme, might also form dead-end complexes E-NAD(P)⁺-glycine betaine. This would result in slope effects of glycine betaine on the kinetics when betaine aldehyde is varied, and uncompetitive effects when the dinucleotide is varied, which would add to those originating from the formation of the non-productive ternary complexes E-NAD(P)H-glycine betaine. Even if release of products is random, the affinity of free enzyme for glycine betaine is so low compared with the affinity for the reduced dinucleotides (Table 2) that it can be safely concluded that under normal *in vivo* and *in vitro* conditions there is not kinetically significant levels of the binary complex E-glycine betaine and, so, the added reduced dinucleotides can only bind to free enzyme. Moreover, as NAD(P)H cannot reverse the reaction flux, they could be considered as dead-end analogues of the oxidized dinucleotides. So the inhibition patterns of the reduced dinucleotides will be interpreted within this framework.

Data for dead-end inhibition in the NADP⁺-dependent reaction (Table 3) point to a steady-state random addition of substrates, as ADP and choline are competitive versus the substrate to which they are analogues and non-competitive or mixed inhibitors versus the other substrate. In such mechanism, both ADP and choline bind to free enzyme and also to

E-betaine aldehyde or to E-NADP⁺, respectively, and thus saturation by NADP⁺ or betaine aldehyde will overcome the inhibition by their respective analogues but not by the analogue of the other substrate. The mixed inhibition of the analogues of betaine aldehyde versus NADP⁺ and the non-competitive inhibition of ADP versus betaine aldehyde are the key patterns that define the kinetic mechanism as random. The competitive component of the inhibition by choline and benzaldehyde against the dinucleotide is weaker than the uncompetitive component but it is clearly present. Therefore, taken together, the product and dead-end inhibition data are consistent with a steady-state random addition of substrates and release of products in both reactions.

The initial velocity patterns in a steady-state random mechanism may appear linear depending on the values of the *off* constants for the substrates from the complexes with the enzyme relative to that of the k_{cat} [33]. These patterns may be fitted to the equation for a rapid equilibrium random mechanism, eqn. (2), but this fit will give incorrect values of the dissociation constants. Quantitative validity of the $K_i^{\text{NADP}^+}$ and $K_i^{\text{betaine aldehyde}}$ values, estimated from a fit of the initial velocity data of the NADP⁺-dependent reaction to eqn. (2) assuming either rapid equilibrium random addition of substrates or ordered mechanisms in which the first substrate is NADP⁺ or betaine aldehyde, was ascertained from calculation of true dissociation constants of NAD(P)⁺ and betaine aldehyde from their binary complexes with free enzyme. Dissociation constants were determined taking advantage of the quenching in intrinsic protein fluorescence elicited by the dinucleotides, or of the protection afforded by the aldehyde against inactivation of the enzyme by chemical modification (González-Segura, L. and Muñoz-Clares, R. A., unpublished work). True dissociation constants of $45.3 \pm 3.1 \mu\text{M}$, $85.4 \pm 2.4 \mu\text{M}$, and $1.35 \pm 0.07 \text{ mM}$ were determined for NADP⁺, NAD⁺,

and betaine aldehyde, respectively. The K_d value of the E-NADP⁺ complex is in excellent agreement with the initial velocity determined value, whereas that of the E-NADP⁺ is about 2-fold lower, and that of the E-betaine aldehyde is more than 5-fold higher than the $K_i^{\text{betaine aldehyde}}$ value, calculated from the initial velocity patterns (Table 1). These results rule out both a random rapid equilibrium or an ordered mechanism with betaine aldehyde binding first. In the NADP⁺-dependent reaction, the mechanism appears to be predominantly ordered with NADP⁺ combining with the enzyme first, at least in the substrates concentration range used in our studies, which it is expected not to be far from to the physiological one. In the NAD⁺-dependent reaction, our data support a random steady state kinetic mechanism, although the reaction pathway in which the dinucleotide binds first may still be the preferred one. The differences in the degree of randomness between the reactions with both dinucleotides might be due to the lower affinity of the free enzyme for NAD⁺ than for NADP⁺, which under identical conditions would result in higher steady state levels of the complex E-betaine aldehyde in the NAD⁺-dependent reaction. In addition, it is possible that NAD⁺ binds better than NADP⁺ to the latter complex.

NADPH inhibition patterns are consistent with either ordered, NADP⁺ binding first, or random addition of substrates, since in both mechanism saturation by NADP⁺ will overcome the inhibition by the reduced dinucleotide. However, the non-competitive effects of NADH against NAD⁺ and betaine aldehyde are not consistent with either random or ordered addition of substrates. Assuming that the steady-state levels of E-glycine betaine are negligible and, therefore, that the complex E-glycine betaine cannot form, as discussed above, NADH will bind only to the free enzyme and should be competitive versus NAD⁺. Formation of an abortive E-betaine aldehyde-NADH complex, which would account for the

uncompetitive component of the inhibition against NAD^+ , is ruled out by the lack of inhibition by betaine aldehyde, even in the presence of added NADH (results not shown). ADP was also non-competitive against NAD^+ , whereas it was competitive against NADP^+ , thus confirming the differences between the two reactions in the patterns of inhibition by the reduced dinucleotides, which, as discussed above, behave as dead-end inhibitors. Non-competitive inhibition of NADH versus NAD^+ has been found before with the enzymes from amaranth [27] and from porcine kidney [25] and was considered evidence for iso mechanisms, in which there is an isomerisation step of the free enzyme and both dinucleotides bind to different free enzyme forms. However, an alternative and plausible explanation arises from the observed parabolic slope effects of NADH, and ADP, which indicate the consecutive addition of two nucleotide molecules to the enzyme, yielding E-NADH_2 and E-ADP_2 dead-end complexes. The second molecule of nucleotide might combine at the betaine aldehyde binding site, as suggested by the change of shape of Dixon plots for ADP inhibition which goes from clear parabolic at low betaine aldehyde concentrations to almost linear at high aldehyde concentrations. At this respect, it is interesting that mitochondrial aldehyde dehydrogenase contains two α/β dinucleotide binding domains [34]. The structural similarity between the catalytic and coenzyme binding domains is a common feature of several dehydrogenases [35,36]. It is then likely that the linear intercept effect of NADH and ADP in the saturation by NAD^+ be the result of the ability of these nucleotides of adding to the E-NAD^+ complex to give the dead-end complexes $\text{E-NAD}^+\text{-NADH}$ and $\text{E-NAD}^+\text{-ADP}$, respectively. When betaine aldehyde is varied, inhibition by the nucleotides, NADH and ADP, is non-competitive and mixed, respectively, with parabolic slope and intercept effects, compatible with the formation of

the abortive complexes proposed above. Interesting, although inhibition by ADP against NADP⁺ appears to be competitive linear, non-competitive parabolic inhibition against betaine aldehyde was observed. The reason why the parabolic effects of this dead-end inhibitor were not detected with NADP⁺ as the variable substrate might lie in the predominantly ordered mechanism of the NADP⁺-dependent reaction, with the dinucleotide binding first. Combination of a parabolic dead-end inhibitor with the E form in an ordered mechanism results in multiplication of the term that represents this form by $(1 + [I]/K_i + [I]^2/K_i K_i')$. When the second substrate, betaine aldehyde in this case, is fixed and NADP⁺ varied, the slope will be affected as shown in eqn. (12)

$$\text{Slope} = K_{ia}K_b/V[B] + (K_s/V)(1 + [I]/K_{ic} + [I]^2/K_{ic}K_{ic}') \quad (12)$$

whereas when NADP⁺ is fixed and betaine aldehyde varied the slope is affected as shown in eqn. (13):

$$\text{Slope} = K_{ia}K_b/V[A] + (K_b/V)(1 + [I]/K_{ic} + [I]^2/K_{ic}K_{ic}') \quad (13)$$

From the values of the kinetic constants given in Table 1, and considering the concentration of the fixed substrate in these experiments given in Table 3, it can be calculated that the factor multiplying the term representing the inhibitor is almost 6-fold higher when betaine aldehyde is varied than when NADP⁺ is. Thus, higher concentrations of the inhibitory nucleotides are required to observe parabolic inhibition against NADP⁺ than against betaine aldehyde. This was in fact confirmed with ADP, since using high ADP concentrations we observe parabolic Dixon plots at fixed NADP⁺ and betaine aldehyde (Figure 3). In the case of the reduced dinucleotide, the high absorbance of the assay medium at high concentrations of NADPH precluded the experimental confirmation of this conclusion. Therefore, the finding of competitive linear inhibition of NADPH versus NADP⁺, instead of

the non-competitive parabolic found for NADH, might be due to steady-state levels of the E-NADP⁺-NADPH and E-NADPH₂ complexes that are not kinetically significant in the NADPH concentration range used in our experiments.

The parabolic inhibition by the nucleotides is fully consistent with the substrate inhibition by NAD(P)⁺ found in both the NAD⁺- and NADP⁺-dependent reactions. NADP⁺ behaves as a linear non-competitive inhibitor against betaine aldehyde. As the inhibition was total, it cannot be produced by a slower alternative route of reaction that takes place at high NAD(P)⁺ concentrations. Given the kinetic mechanism of *P. aeruginosa* BADH, NAD(P)⁺ could form three possible non-productive complexes with the enzyme: E-glycine betaine-NAD(P)⁺, E-NAD(P)H-NAD(P)⁺, and E-NAD(P)₂⁺. Formation of the first is not very likely, since it requires kinetically significant levels of the complex E-glycine betaine, which are not observed even when glycine betaine up to 30 mM is added to the reaction medium. Therefore, the most probable explanation for the NAD(P)⁺ inhibition is the formation of the non-productive complexes E-NAD(P)₂⁺ and E-NADPH-NADP⁺, which would account for the observed mixed pattern of inhibition versus betaine aldehyde. Taken together, our results from dead-end and substrate inhibition support the existence in *P. aeruginosa* BADH of two binding sites for the nucleotides, with very different affinities.

In ordered or rapid equilibrium random mechanisms $K_b = k_{-2}/k_{+2}$ and it is therefore the true dissociation constant of B from the EAB complex. This definition is also reasonably valid for steady-state random mechanisms [33]. Thus, we can compare the K_m for betaine aldehyde estimated from the initial velocity patterns in the NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions with the dissociation constant of betaine aldehyde from the E-betaine aldehyde complex determined by chemical modification. From these comparisons it appears that

betaine aldehyde has a 3-fold weaker affinity for the free enzyme than for the E-NAD(P)⁺ complexes, consistently with the proposed preferred order of binding of substrates. The same conclusion applies to betaine analogues, as can be deduced from the inhibition constants given in Table 3.

The uncompetitive partial substrate inhibition by the aldehyde found in the NADP⁺-dependent reaction is suggestive of the formation of the complex E-NADPH-betaine aldehyde, which leads to the E-betaine aldehyde by release of NADPH, and finally to the central productive complex after combination with NADP⁺. We did not observe inhibition by high concentrations of the aldehyde in the NAD⁺-dependent reaction, which might be due at least in part to low steady-state levels of the complex E-NADH. This suggestion is supported by the high K_{ic} values for NADH, about 3-4-fold higher than the corresponding values for NADPH (Table 2).

In summary, we propose that the simplest kinetic model that accounts for the observed initial velocity and inhibition patterns of *P. aeruginosa* BADH is a steady-state bi bi random mechanism, with a preferred route of addition of substrates and release of products, particularly in the NADP⁺-dependent reaction which is predominantly ordered, as outlined in Scheme 1. This mechanism is quite different than that reported for other BADHs. Based only on initial velocity studies it has been concluded that the enzymes from *C. didymum* and *E. coli* follow a ping-pong mechanism [21,22]. However, ping-pong mechanisms are not consistent with the chemistry of the aldehyde dehydrogenases [37], and contrast with the known sequential mechanism of aldehyde dehydrogenases [38-40]. Based on initial velocity, product and dead-end inhibition studies, steady state ordered iso mechanisms have been proposed for BADH from amaranth leaves [27] and from porcine kidney [25]. The

kinetic mechanisms of BADHs might not be so different, however, and deserve to be re-evaluated. Thus, it is interesting that the amaranth enzyme follows an apparent ping-pong mechanism at high substrate concentrations [41] and exhibits substrate inhibition by the dinucleotide [42]. If the mechanism of this inhibition is the same than the one we are proposing for *P. aeruginosa* BADH, the mixed inhibition of NADH versus NAD⁺ could be accounted for by formation of the complex E.NAD⁺-NADH, as discussed above, and an iso mechanism would not be required to explain the uncompetitive effects. Substrate inhibition by the dinucleotide has also been found in glutamic γ -semialdehyde dehydrogenase from human liver [43] but the mechanism of this inhibition has not been elucidated.

Physiological implications of the kinetic mechanism

BADH from *P. aeruginosa* has a dual nucleotide specificity, consistent with serving either anabolic or catabolic roles depending on whether it uses NADP⁺ or NAD⁺. On the basis of the $k_{cat}/K_m^{dinucleotide}$ values, NAD⁺ was 4-fold less effective than NADP⁺ as coenzyme of the *P. aeruginosa* BADH reaction but the [NAD⁺]/[NADP⁺] ratio, which is supposed to be around 5 [44,45], may overcome these differences. In addition, the ratio of the two BADH activities might be regulated by the [NAD⁺]/[NADH] or [NADP⁺]/[NADPH] ratios.

When *P. aeruginosa* grows in choline or choline precursors, BADH appears to fulfil an amphibolic metabolic role similar to that fulfilled by glucose-6-phosphate dehydrogenase when the bacteria grow in glucose, since *P. aeruginosa* catabolizes glucosa via the Entner-Doudoroff pathway [46]. It is interesting that the kinetic parameters for the coenzymes and the substrates have very close values in both enzymes [47 and this work]. The kinetic

mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *P. aeruginosa* has not been elucidated to date, but it has been reported that the mechanism of the same amphibolic enzyme from *Leuconostoc mesenteroides* is ordered for the NADP⁺-dependent reaction and random for the NAD⁺-dependent [48]. Even more, the inhibition patterns of the *L. mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase by the reduced dinucleotides are also very similar to those of *P. aeruginosa* BADH. In both enzymes, NADPH is a uncompetitive inhibitor versus NADP⁺ whereas NADH is a mixed inhibitor versus NAD⁺ [48]. The use of NAD⁺ over NADP⁺ in glucose-6-phosphate dehydrogenase is promoted by increasing the concentration of glucose-6-phosphate [49]. The preference of *P. aeruginosa* BADH for the coenzyme used seems also to be affected by the concentration of betaine aldehyde, although to a lesser extent, as suggested by the value of $k_{cat}/K_m^{betaine\ aldehyde}$, which is 25% higher in the NAD⁺-than in the NADP⁺-dependent reaction (Table 1). Given the similarities mentioned, it is most likely that both enzymes, glucose-6-phosphate dehydrogenase and BADH, are subjected to the same mechanisms of metabolic regulation in order to provide the bacteria with its requirements of NAD⁺ or NADP⁺.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-2552P-N).

REFERENCES

1. Wyn Jones, R. G. and Storey, R. (1981) in *Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants* (Paleg, L. and Aspinall D., eds.) pp. 171-204, Academic Press, Sydney.
2. Pan, S., Moreau, R. A., Yu, C. and Huang, A. H. C. (1981) *Plant Physiol.* **67**, 1105-1108.
3. Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 56-63.
4. Arakawa, K., Katayama, M. and Takabe, T. (1990) *Plant Cell Physiol.* **31**, 797-807.
5. Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A. (1994) *J. Plant Physiol.* **143**, 145-152.
6. Petronini, P. G. M., De Angelis, E., Borghetti, P., Borghetti, A. F. and Wheelers, K. P. (1992) *Biochem. J.* **282**, 69-73.
7. Landalf, B. and Strom, A. R. (1986) *J. Bacteriol.* **165**, 849-855.
8. Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y. and Ogata, K. (1976) *Agr. Biol. Chem.* **40**, 1743-1749.
9. Mori, N., Yoshida, N. and Kitamoto, Y. (1992) *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 352-356
10. Bernard, T., Perroud, B., Pocard, J. A. and Le Rudulier, D. (1986) *Arch. Microbiol.* **143**, 359-364.
11. Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T. and Le Rudulier, D. (1988) *J. Bacteriol.* **170**, 3142-3149.
12. D'souza-Ault, M. R., Smith, L. T. and Smith, G. M. (1993) *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 473-478.
13. Lisa, T. A., Casale, C. H. and Domenech, C. E. (1994) *Curr. Microbiol.* **28**, 71-76.
14. Rennick, B. R. (1981) *Am. J. Physiol.* **240**, F83-F89.

15. Pesin, S. R. and Candia, O. A. (1982) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **22**, 651-659.
16. Wrigth, J. R. and Clements, J. A. (1987) *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**, 426-444.
17. Matthews, L. W. S., Spector, J. L., Lemm, J., and Potter, J. L. (1963) *Am. Rev. Respir. Dis.* **88**, 199-204.
18. Shortridge, V. D., Lazdunski, A. and Vasil, M. L. (1992) *Mol. Microbiol.* **6**, 863-871.
19. Ostroff, R. M., Wretlind, B. and Vasil, M. L. (1990) *J. Bacteriol.* **172**, 5915-5923.
20. Sage, A. E., Vasil, A. I. and Vasil, M. L. (1997) *Mol. Microbiol.* **23**, 43-56.
21. Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y. and Yamada, H. (1980) *Agric. Biol. Chem.* **40**, 3015-3016.
22. Falkenberg, P. and Strom, A. R. (1990) *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 253-259.
23. Dragolovich, J. and Pierce, S. K. (1994) *J. Exp. Zool.* **270**, 417-425.
24. Chern, M. K. and Pietruszko, R. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 561-568.
25. Figueroa-Soto C. G. and Valenzuela-Soto, E. M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 596-603.
26. Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. and Muñoz-Clares, R. A. (1999) *J. Bacteriol.* **181**-1292-1300.
27. Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 23818-23823, and Additions and Corrections, *J. Biol. Chem.* **269**, 4692.
28. Marquardt, D.W. (1963) *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431-441.
29. Cleland, W. W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **467**, 104-137.
30. Chen, R. F. and Hayes, J. E. (1965) *Anal. Biochem.* **1**, 523-529.

31. Lakowics, J. R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press, New York, USA.
32. Cleland, W. W. (1970) in *The Enzymes*, 3rd Edition (Boyer, P. D. ed.) vol II, pp 1-65, Academic Press, New York, USA.
33. Bar-Tana, J. and Cleland, W. W. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 1271-1276.
34. Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. and Hurley, T. D. (1997) *Structure* **5**, 701-711.
35. Kutzenko, A. S., Lamzin, V. S. and Popov, V.O. (1998) *Febbs Lett.* **423**, 105-109.
36. Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. and Eklund, H. (1998) *Prot. Sci.* **7**, 2106-2117.
37. Farrés, J., Wang, T. T. Y., Cunningham, S. J. and Weiner, H. (1995) *Biochemistry* **34**, 2592-2598.
38. Bradbury, S. L. and Jakoby, W. B. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 1834-1840.
39. Rivett, A. J. and Tipton, K. F. (1981) *Eur. J. Biochem.* **117**, 187-193.
40. Ryzewski, C. N. and Pietruszko, R. (1980) *Biochemistry*, **19**, 4843-4848.
41. Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R., Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A. (1997) *Biochem. Biophys. Acta* **1341**, 49-57.
42. Muñoz-Clares, R. A., Vojtechová, M., Mújica-Jiménez, C. and Rodríguez-Sotres, R. (1996) *Adv. Exp. Med. Biol.* **414**, 261-268.
43. Forte-McRobbie, C. M. and Pietruszko, R. J. (1986) *Biol. Chem.* **261**, 2154-2163.
44. Kaplan, N. O. (1960) In *The Enzymes*, (Boyer, P. D., Lardy, H. and Myrback, K., eds.) vol III, p. 105, Academic Press, New York, USA.
45. Takebe, I. and Kitahara, H. (1963) *J. Gen. Appl. Microbiol.* **9**, 31-40.

46. Hunt, J. C., and Phibbs, P. V. Jr. (1983) *J. Bacteriol.* **154**, 793-802.
47. Ma, J. -F., Hager, P. W., Howell, M. L., Phibbs, P. V. and Hassett, D. J. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 1741-1749.
48. Levy, R. H., Christoff, M, Ingulli, J. and Ho, E. M. L. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 473-488.
49. Levy, R. H., Daouk, G. H. and Katopes, M. A. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **198**, 406-413.

Table 1. Kinetic Parameters of the NADP⁺- and NAD⁺-Dependent BADH^a from *P. aeruginosa*.

parameter ^b	NADP ⁺	NAD ⁺
V (U/mg)	143.0 ± 6.1	151.9 ± 7.8
k_{cat} (s ⁻¹)	261.0 ± 11.1	276.5 ± 14.2
$K_i^{dinucleotide}$ (μM)	47.7 ± 7.7	185.6 ± 35.1
$K_m^{dinucleotide}$ (μM)	83.4 ± 8.8	385.2 ± 42.7
$K_i^{betaine\ aldehyde}$ (μM)	289.6 ± 55.7	209.2 ± 41.4
$K_m^{betaine\ aldehyde}$ (μM)	506.8 ± 43.1	434.5 ± 44.5
$k_{cat}/K_m^{dinucleotide}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.6 × 10 ⁶	3.6 × 10 ⁵
$k_{cat}/K_m^{betaine\ aldehyde}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	2.6 × 10 ⁵	3.1 × 10 ⁵

^aAll initial velocities were obtained in potassium phosphate buffer pH 8.0, at 30 °C, under the conditions described in Materials and Methods.

^bValues ± SE were estimated by a fit of the initial velocity data in Fig. 1 to eq 2.

Table 2. Product Inhibition Patterns and Inhibition Constants for the NADP⁺- and NAD⁺-Dependent BADH^a from *P. aeruginosa*.

variable	fixed	product	pattern ^b	K_{is}	K_{is}'	K_{ii}	K_{ii}'
substrate	substrate			(μ M)	(μ M)	(μ M)	(μ M)
NADP ⁺	BA (0.5 mM)	NADPH	C	182 ± 10			
BA	NADP ⁺ (0.1 mM)	NADPH	MX	384 ± 39		675 ± 79	
NADP ⁺	BA (0.175 mM)	GB	MX	742 ± 408 × 10 ³		278 ± 42 × 10 ³	
BA	NADP ⁺ (0.1 mM)	GB	NC	495 ± 50 × 10 ³		495 ± 50 × 10 ³	
NAD ⁺	BA (1.0 mM)	NADH	S-P I-L NC	1075 ± 179	287 ± 152	1075 ± 179	

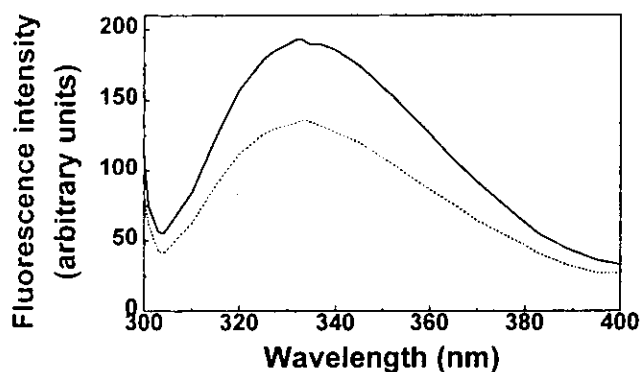


FIG. 5. Fluorescence emission spectra of BADH from *P. aeruginosa*. Fluorescence emission spectra in the absence (solid line) and presence (dashed line) of 0.5 mM NADP⁺ are shown. The enzyme (164 μ g/ml) was in potassium phosphate buffer (pH 6.9) containing 0.1 mM EDTA, 20% (wt/vol) sucrose, and 25 mM KCl.

enzyme from amaranth leaves interacted with the polyclonal anti-BADH from *P. aeruginosa*. In this experiment, care was taken to load a larger amount of whole protein in cell extracts from *E. coli* than in those from *P. aeruginosa*, considering the reported specific activities of the pure enzymes (reference 14 and this work).

Kinetic properties of the purified BADH. The following studies were carried out in order to compare the main kinetic features of the *P. aeruginosa* BADH purified by us with those of the previously purified enzyme (35) and BADHs from other sources. Similar to other BADHs (3, 14, 52), the *Pseudomonas* enzyme obeyed Michaelis-Menten kinetics for the two substrates and exhibited substrate inhibition by the aldehyde. At 30°C, pH 8.0, and 0.5 mM NADP⁺, the observed substrate inhibition was partial, as in the case of amaranth BADH (53). Fitting the experimental data to equation 2 gives an apparent K_i for betaine aldehyde of 4.6 ± 1.4 mM and a β value of 0.55 ± 0.02 . The enzyme showed a high degree of specificity at the binding site of the aldehyde, as previously suggested (35). We found that it could not catalyze the NADP⁺- or NAD⁺-dependent oxidation of other aldehydes, including those with a positive charge, such as γ -aminobutyraldehyde or 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde, which have been recently shown to be good substrates of mammalian (9) and plant (51, 54) BADHs. The former aldehyde was found, however, to be an efficient inhibitor of the oxidation of betaine aldehyde, indicating that it can bind to the active site with high affinity. Since in betaine aldehyde the length of the chain between the positive charge and the carbonyl group is two carbons and one carbon shorter than those in γ -aminobutyraldehyde and 3-dimethylsulfoniopropionaldehyde, respectively, it is possible that the distance between the recognition subsites for the positive charge and the aldehyde function in the active site of *Pseudomonas* BADH imposes restrictions for the reaction to occur with aldehydes other than betaine aldehyde. The absence of reaction with γ -aminobutyraldehyde is consistent with the fact that *Pseudomonas* species possess an inducible NAD⁺-dependent aldehyde dehydrogenase specific for this aldehyde (19).

Regarding the nucleotide, we confirmed the previous report (35) indicating that the enzyme preferentially used NADP⁺ over NAD⁺, although both nucleotides can be used. In this respect BADH from *Pseudomonas* resembles the enzyme from *X. translucens* (34), but it is different from all other BADHs studied to date, which prefer NAD⁺ as the coenzyme (3, 9, 12, 14, 33, 52, 55). At 0.5 mM NADP⁺, 100 mM potassium phos-

phate buffer (pH 7.5), and 37°C, the apparent K_m for betaine aldehyde, estimated by using several concentrations of the aldehyde from 0.1 to 2.0 mM, was 453 ± 52 μ M. The apparent K_m values for NADP⁺ and NAD⁺, determined with the same buffer and also at 37°C by holding the concentration of betaine aldehyde at 1.0 mM and varying the concentration of NADP⁺ in a range of 0.025 to 0.5 mM and that of NAD⁺ in a range of 0.05 to 1 mM, were 62 ± 7 and 229 ± 5 μ M, respectively. These apparent K_m values are in full agreement with those previously reported for the *Pseudomonas* BADH (35). The apparent V_{max} values, estimated at a fixed 1.0 mM betaine aldehyde concentration with NADP⁺ or NAD⁺ as the varied substrate, were 121 ± 4 and 133 ± 4 U/mg of protein, respectively. These values are similar to those reported for the enzyme from *X. translucens* (34) and are as much as 3- and 50-fold greater than those of purified BADHs from *E. coli* (14) and plants (1, 52, 55), respectively.

The effect of pH on the activity of purified BADH was measured under the standard assay conditions over the pH range of 6.0 to 9.5, in which we found that the enzyme is stable (not shown). Maximum enzyme activity was obtained at pH 8.0 in Tris-HCl buffer (results not shown). This behavior contrasts with that of amaranth BADH, which is inhibited by Tris (52), but is similar to that of the *B. subtilis* enzyme (3). In the phosphate-pyrophosphate buffering system, the enzyme showed an optimum pH of 8.0 to 8.5. Similar to the case for other BADHs (34, 35, 52), the velocity-versus-pH profile is a bell-shaped curve (Fig. 6A). Two macroscopic pK values, 7.0 ± 0.1 on the acidic side and 9.7 ± 0.1 on the basic side, were estimated from a fit of the experimental data to equation 3. Given that the ionizable groups of NADP⁺ and betaine aldehyde have pKs different from those estimated in the experiments described above (11), it appears that the enzyme possesses two ionizable groups involved in catalysis and/or binding of substrates.

The energy of activation of the reaction was measured by performing enzyme assays at various temperatures in a range of 12 to 40°C under otherwise-standard conditions. The Arrhenius plot of the data (Fig. 6B) was linear, and the energy of enzyme activation calculated from the slope of this plot was 39.8 kJ mol⁻¹. This value is considerably lower (by 22 kJ mol⁻¹) than the activation energy of the amaranth enzyme (52), which is consistent with the much higher specific activity of the *P. aeruginosa* enzyme.

Stability of the purified BADH. The purified BADH (31 μ g/ml) lost catalytic activity at 40°C in a biphasic inactivation process with an initial fast phase followed by a slower reaction (Fig. 7A). Eventually, an equilibrium between active and inactive forms is reached. A simple model consistent with these features of the thermal inactivation is $A \rightleftharpoons I \rightleftharpoons I'$, where A is the active form of the enzyme, which equilibrated fairly rapid with I, an inactive form. This then decays in an apparent reversible reaction to another inactive form of the enzyme, I'. For this model, the equation relating the change in concentration of A to time is equation 4, described in Materials and Methods. As can be seen, the fits of the experimental data to this equation are very good, giving apparent first-order rate constants of 0.142 ± 0.019 and 0.014 ± 0.007 min⁻¹ for the fast and slow phases, respectively, and 28% of residual activity at equilibrium. Similar results were obtained with an enzyme 10-fold more concentrated (not shown). When the partially heat-inactivated enzyme is cooled to 30°C or lower, activity is regained in a time-dependent process, consisting of two clearly distinct phases, with apparent first-order rate constants of 0.106 ± 0.040 and 0.003 ± 0.001 min⁻¹. The presence of saturating concentrations of NADP⁺ (500 μ M) during incubation af-

Table 2 (continuation)

				K_{is}	K_{is}'	K_{ii}	K_{ii}'
BA	NAD ⁺ (0.2 mM)	NADH	pNC	3424 ± 1960	153 ± 122	3424 ± 1960	153 ± 122
NAD ⁺	BA (0.15 mM)	GB	NC	482 ± 21 × 10 ³		482 ± 21 × 10 ³	
⁶⁹ BA	NAD ⁺ (0.5 mM)	GB	MX	325 ± 35 × 10 ³		547 ± 100 × 10 ³	

^aInitial velocities were obtained as described under Materials and Methods, in potassium phosphate buffer, pH 8.0, 30 °C.

^bInitial velocity data were globally fitted to the equation for competitive (C), mixed (MX), noncompetitive (NC), S-parabolic I-linear noncompetitive (S-P I-L NC), or parabolic noncompetitive inhibition (pNC), as appropriate.

Table 3. Dead-End Inhibition Patterns and Inhibition Constants for NADP⁺- and NAD⁺-Dependent BADH^a from *P. aeruginosa*.

variable	fixed	inhibitor	pattern ^b	K_{is}^c	$K_{is}'^c$	K_{ii}^c	$K_{ii}'^c$
substrate	substrate			(mM)	(mM)	(mM)	(mM)
NADP ⁺	BA (0.5 mM)	ADP	C	3.3 ± 0.2			
70 BA	NADP ⁺ (0.1 mM)	ADP	S-P I-L NC	6.3 ± 0.8	9.1 ± 4.3	6.3 ± 0.8	
NADP ⁺	BA (0.5 mM)	choline	MX	135.5 ± 20.4		49.6 ± 5.7	
BA	NADP ⁺ (0.1 mM)	choline	C	26.4 ± 2.5			
NADP ⁺	BA (0.5 mM)	benzaldehyde	MX	0.170 ± 0.030		0.074 ± 0.004	

Table 3 (continuation)

				K_{is}^c	$K_{is}'^c$	K_{ii}^c	$K_{ii}'^c$
NAD ⁺	BA (0.5 mM)	ADP	S-p I-L NC	8.9 ± 0.2	5.6 ± 5.1	8.9 ± 0.2	
BA	NAD ⁺ (0.5 mM)	ADP	p MX	9.3 ± 4.2	5.2 ± 4.5	26.4 ± 20.7	3.7 ± 4.8
NAD ⁺	BA (0.5 mM)	choline	MX	108.5 ± 17.2		40.4 ± 3.2	
BA	NAD ⁺ (0.5 mM)	choline	C	18.1 ± 1.0			

^aInitial velocities were obtained as described under Materials and Methods, in potassium phosphate buffer, pH 8.0, 30 °C.

^bInitial velocity data were globally fitted to the equation for competitive (C), S-parabolic I-linear noncompetitive (S-p I-L NC) mixed (MX), or parabolic mixed inhibition (pMX).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Initial velocity patterns of *P. aeruginosa* BADH reaction

Betaine aldehyde was varied in a range from 0.1 to 1 mM at the following fixed concentrations of NADP⁺ (A) or NAD⁺ (B): 25 (■), 50 (●), 100 (▲), 250 (□), and 500 (○) μM. Assays were carried out under the standard conditions described in the Materials and methods section. In the double reciprocals plots the points are the experimentally determined values, and the lines drawn through these points are those calculated from the best global fit of these data by non-linear regression to eqn. (2). In (B) the dashed lines are from individual linear regression fits of the data in each saturation curve.

Figure 2 NADH inhibition patterns of the NAD⁺-dependent *P. aeruginosa* BADH

(A) Betaine aldehyde was held at a nonsaturating concentration of 1 mM and NAD⁺ was varied in a range from 50 μM to 1 mM at the following fixed concentrations of NADH: 0 (■), 100 (●), 200 (▲), and 400 (□) μM. (B) NAD⁺ was fixed at 200 μM and betaine aldehyde was varied in a range from 0.2 to 1 mM at the following fixed concentrations of NADH: 0 (■), 150 (●), 300 (▲), and 400 (□) μM. Assays were carried out under the standard conditions described the Materials and methods section. In the double reciprocals plots the points are the experimentally determined values, and the lines drawn through these points are those calculated from the best non-linear regression fit of these data to eqn. (6) (A) or to eqn. (7) (B). Insets: Replots of slopes and intersects from the main figures versus NADH concentration.

Figure 3 Inhibition of *P. aeruginosa* BADH by ADP

The concentration of NADP⁺ was 100 μM and that of betaine aldehyde 250 μM (■) or 2.5 mM (□) The points are the experimentally determined values, and the lines drawn through these points are those calculated from the best non-linear regression fit of these data to the equation of a parabola.

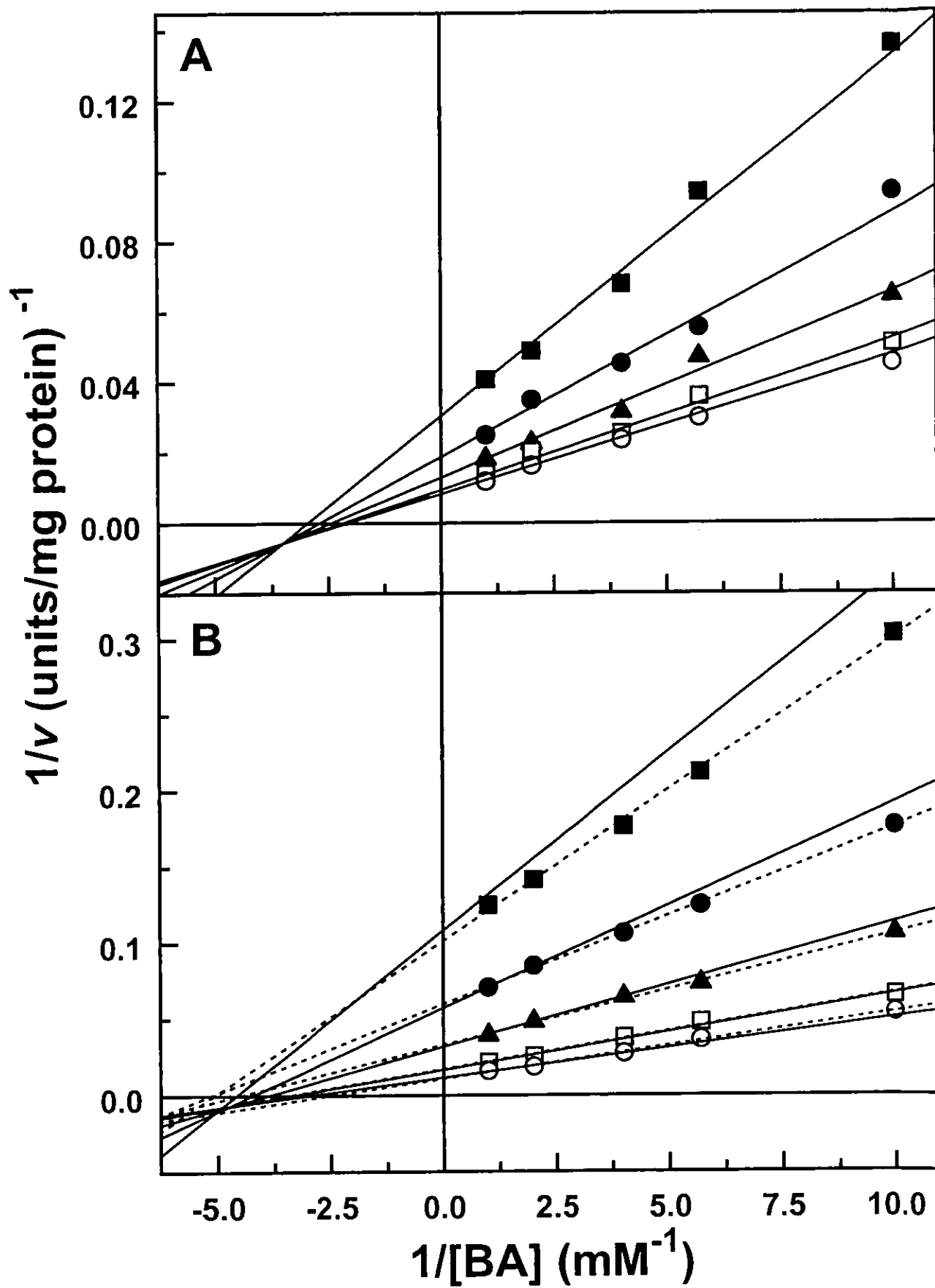
Figure 4 Substrate inhibition of the *P. aeruginosa* BADH by NAD(P)⁺

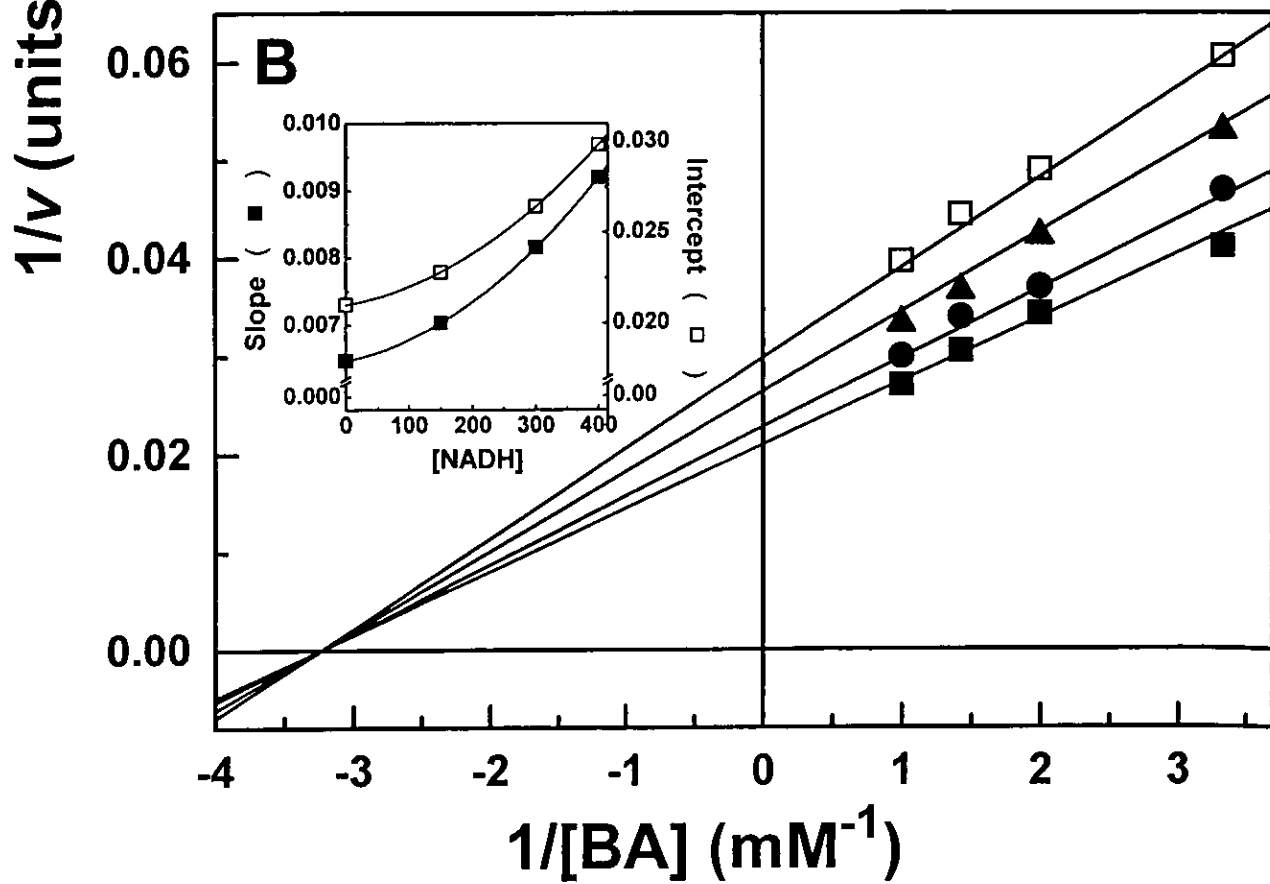
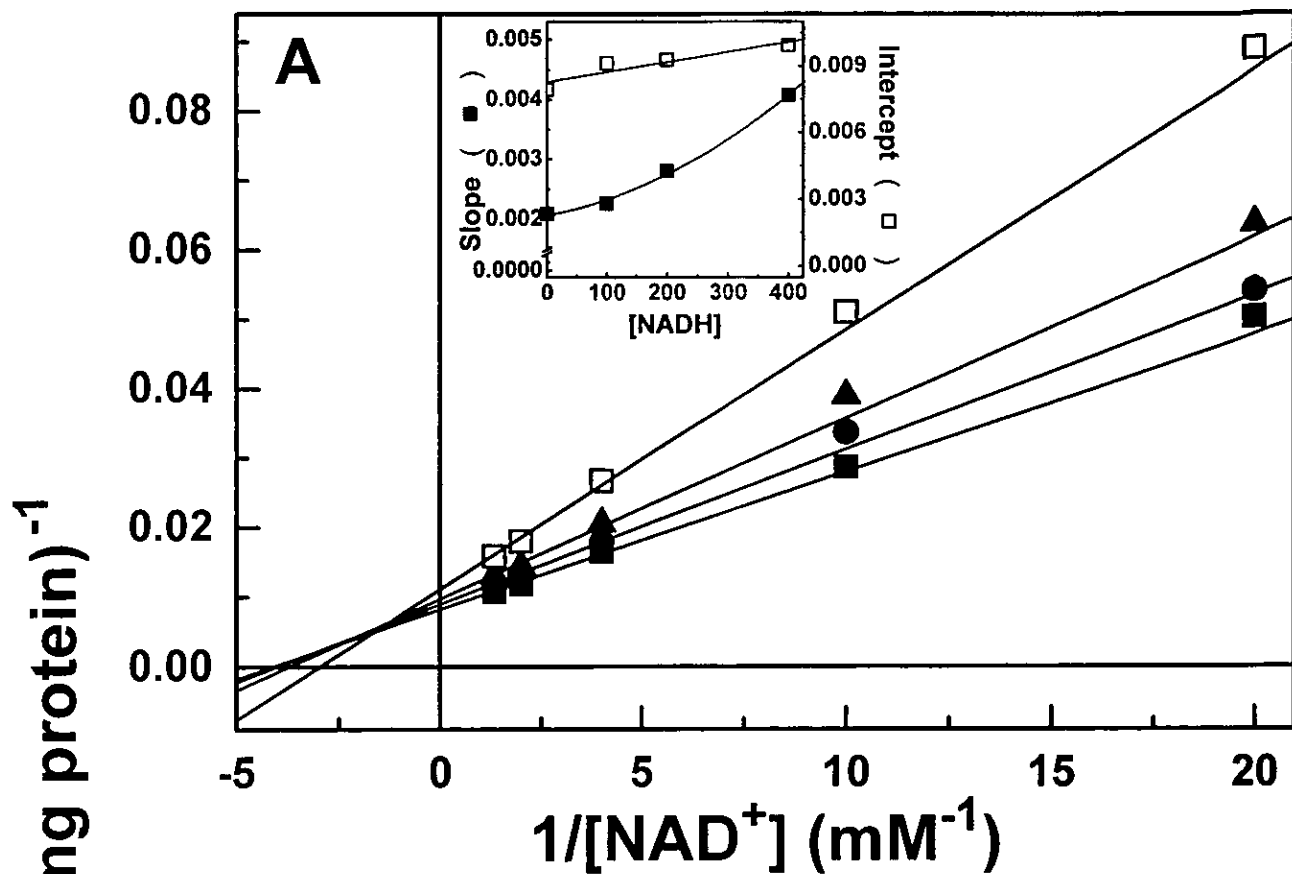
(A) Betaine aldehyde was 200 μM and NADP⁺ (□) or NAD⁺ (■) were varied as indicated. (B) Betaine aldehyde was varied in a range from 0.1 to 1 mM at the following fixed, inhibitory, concentrations of NADP⁺: 1 (■), 3 (●), 6 (▲), and 10 (□) mM. Assays were carried out under the standard conditions described in the Materials and methods section. The points are the experimentally determined values, and the lines drawn through these points are those calculated from the best non-linear regression fit of the data to eqn. (8) (A) or to eqn. (5) (B).

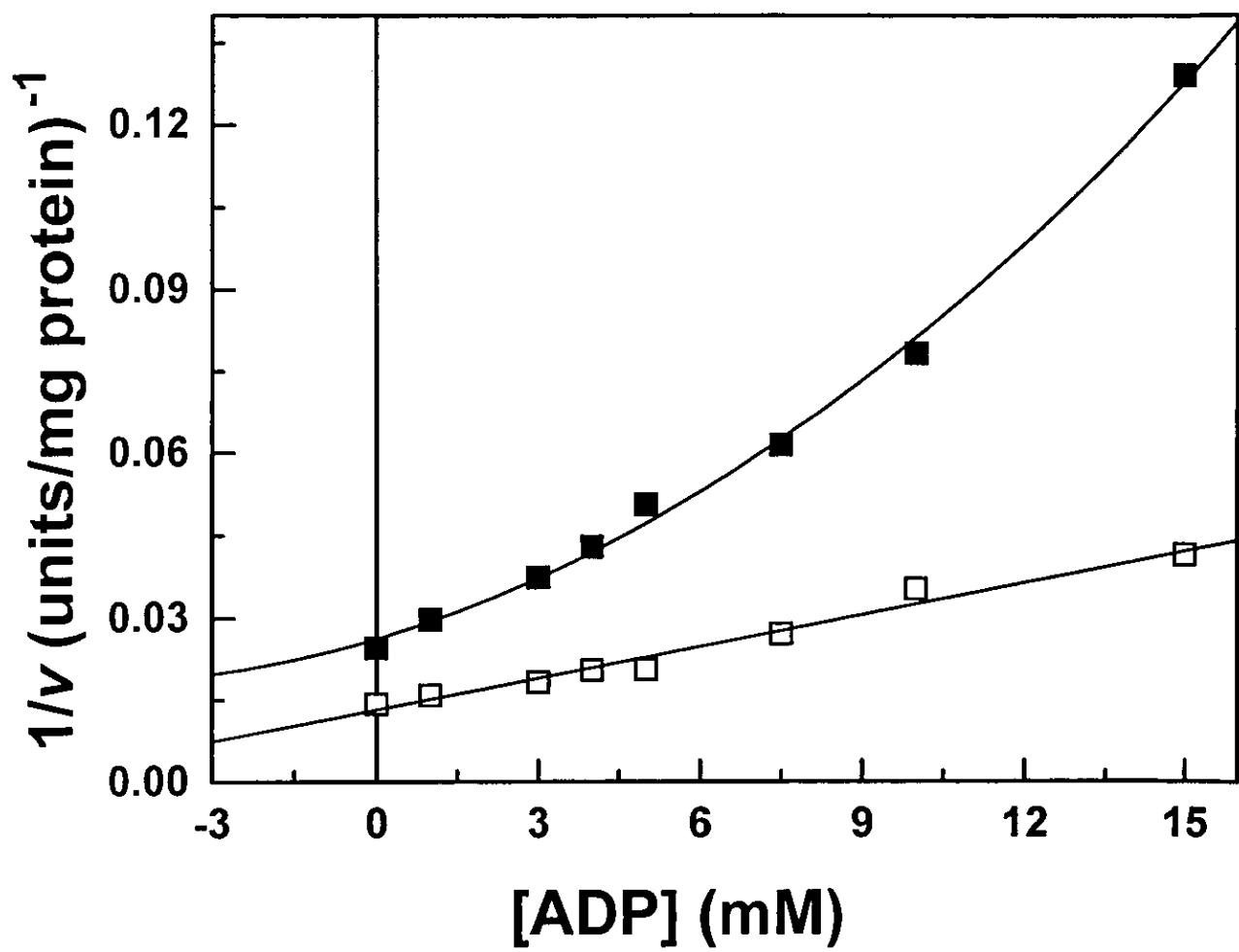
Figure 5 Binding of the oxidized dinucleotides to *P. aeruginosa* BADH

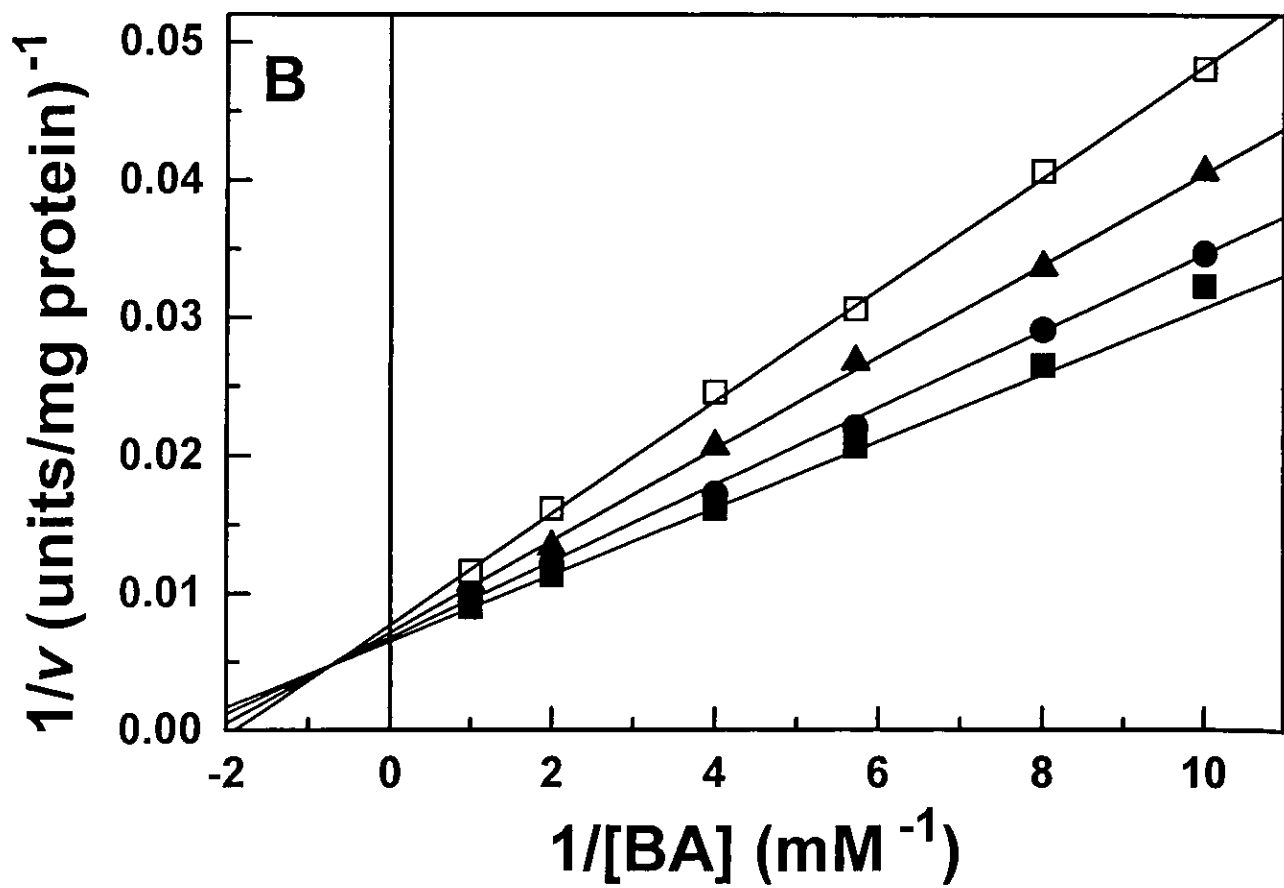
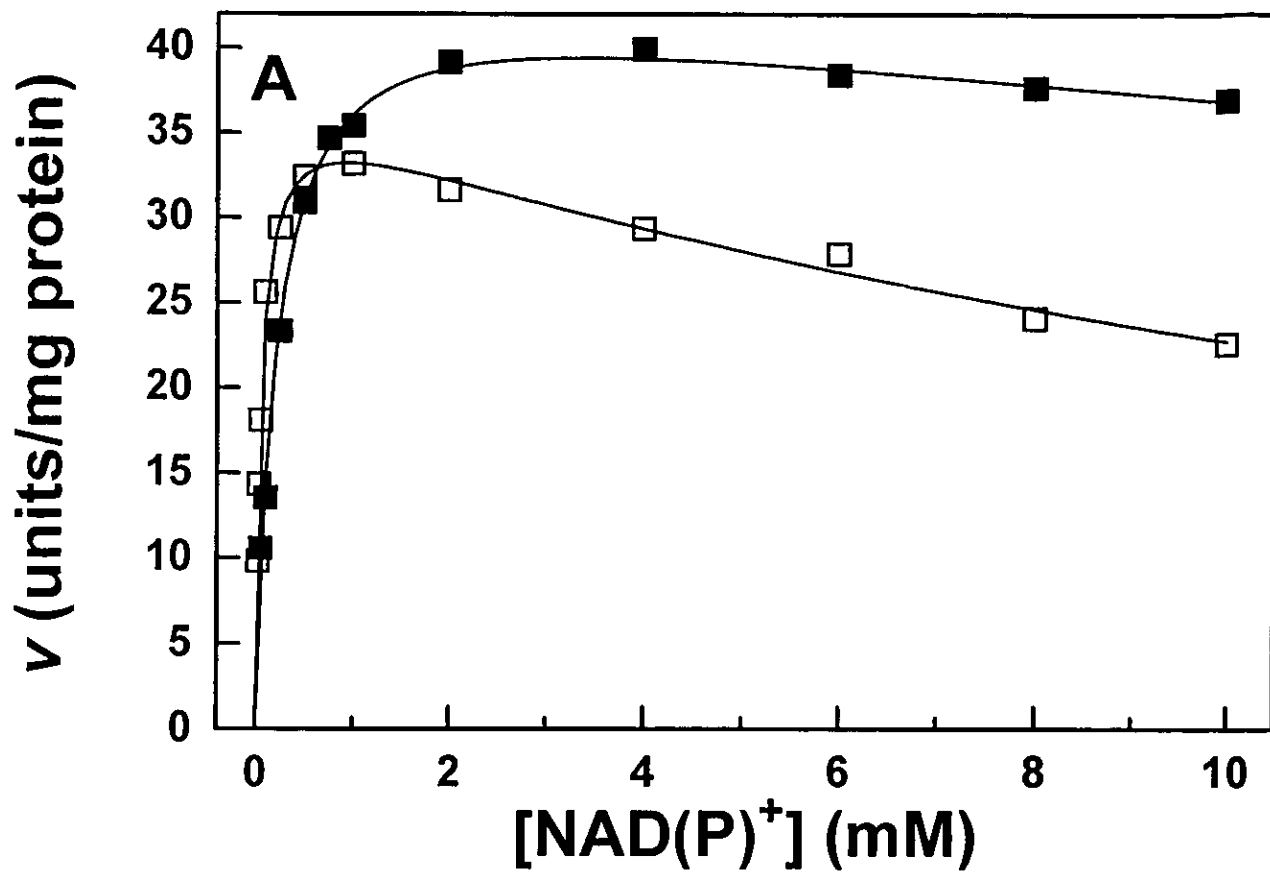
Dependence of the fractional saturation of the enzyme, as measured from the quenching of intrinsic fluorescence, on the concentration of NADP⁺ (□), or NAD⁺(■). The enzyme concentration was 0.8 μM. The data were fitted to eqn. (11).

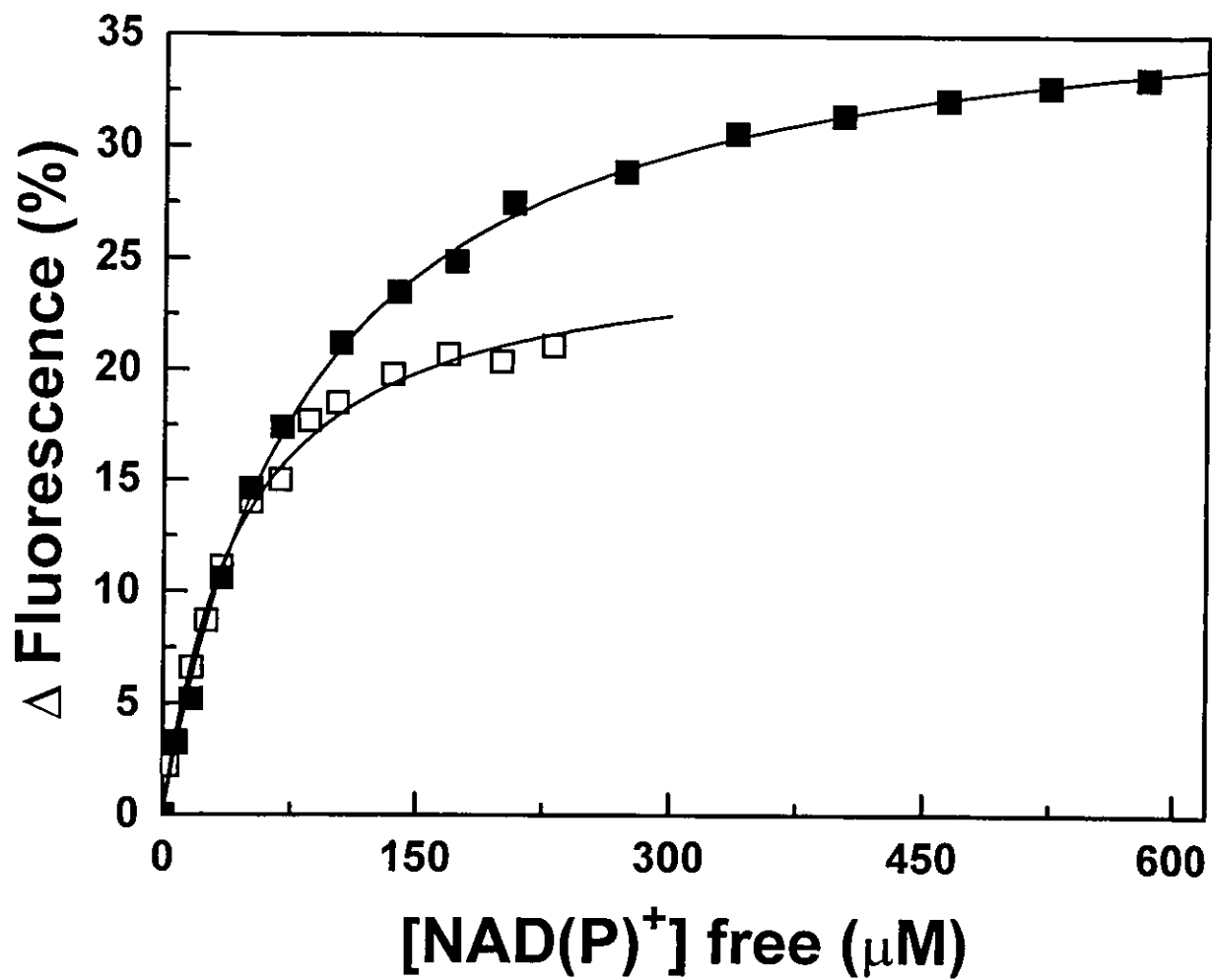
Scheme 1 Proposed kinetic mechanism for *P. aeruginosa* BADH in the absence of products. The preferred route of substrates addition and products release at low concentration of substrates is shown by solid arrows.

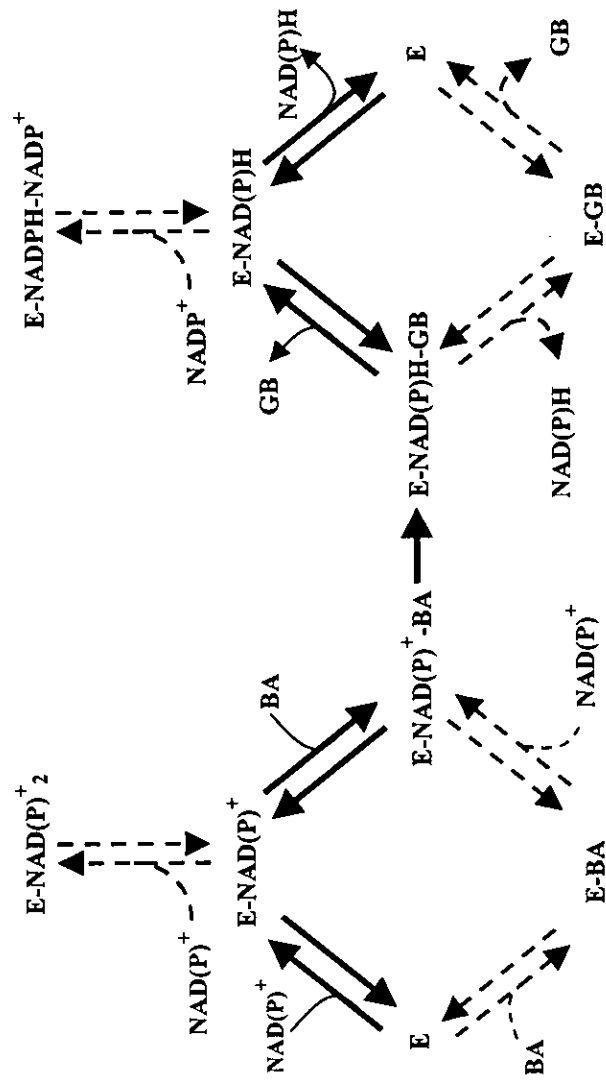












VI.3. Purificación de la enzima BADH

El objetivo inicial de este trabajo fue purificar la BADH de *P. aeruginosa*. Se comenzó por buscar las condiciones de cultivo de la bacteria que indujeran una mayor síntesis de esta proteína. En la cepa K10 de *E. coli* el NaCl 0.4 M aplicado junto con colina 1 mM y glucosa 22 mM producen una cantidad de BADH tal que llega a ser el 0.13% de la proteína total (Landfald y Strom, 1986). En la cepa MC4100 (pFF423) de *E. coli*, en la que el operon *bet* se sacó del cromosoma y se insertó en el plásmido pBR322 (Andresen *et al.*, 1988), las mismas condiciones de cultivo indujeron una expresión de la BADH 15 veces mayor a la encontrada en la cepa K10 (2% de la proteína total) (Falkenberg y Strom, 1990). En este trabajo, 20 mM de colina como única fuente de carbono y nitrógeno en el medio mínimo M63, fue suficiente para estimular la síntesis de la BADH en *P. aeruginosa*, llegando a un 0.7% de la proteína soluble total de las células en la fase estacionaria de crecimiento. En cambio, no se detectó actividad de BADH cuando se utilizó el medio M63 con glucosa y amonio como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente. La adición de NaCl 0.4 M a ambos medios no incremento dicha actividad, a diferencia de lo descrito para *E. coli* (Landfald y Strom, 1986). La presencia de glucosa 11 mM en el medio con colina disminuyó la actividad de BADH (66%), lo que podría ser el resultado de la represión catabólica que presenta este organismo (Collier *et al.*, 1996).

La utilización de la colina como inductor de la síntesis de la BADH en *P. aeruginosa* ya había sido mencionada en dos trabajos en donde se purificó esta enzima (Nagasawa *et al.*, 1976; Russell y Scopes, 1994). El método de purificación que aquí se empleó es rápido y la actividad específica y el rendimiento obtenidos al final del proceso fueron significativamente mayores que en dichos trabajos (ver Cuadro 1 del Artículo I y el análisis que de él se hace), lográndose también una completa homogeneidad en la proteína purificada (Figura 2A del Artículo I).

La actividad específica encontrada para la enzima de *P. aeruginosa* (156 U/mg de proteína, a pH 8.0 y 30 °C) es una de las más altas de las BADHs purificadas hasta ahora (Arakawa *et al.*, 1987; Chern y Pietruzko, 1995; Boch *et al.*, 1997; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1980; Mori *et al.*, 1992; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Weretilnyk y Hanson, 1989), estando únicamente debajo de la reportada para la enzima

de la mitocondria del músculo cardíaco del cangrejo *L. polyphemus* (213 u/mg) (Dragolovich y Pierce, 1994) y siendo 195 veces mayor que la del primer reporte de purificación de la BADH de *P. aeruginosa* (0.8 U/mg de proteína) (Nagasawa *et al.*, 1976).

VI.4. Propiedades fisicoquímicas de BADH

La masa molecular de la subunidad de nuestra enzima (60.9 kDa) se sobrestima cuando se determina por electroforesis en un gel de acrilamida con SDS (Figura 2A del Artículo 1), al igual que para las enzimas de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1997), *A. hypochondriacus* (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y *S. oleracea* (Weretilnyk y Hanson, 1989) (ver Cuadro 1 para una comparación entre las características fisicoquímicas de diferentes BADHs). La ineficacia de este método para calcular la masa de la subunidad es difícil de explicar; sin embargo, se puede observar que de manera coincidente las cuatro enzimas antes mencionadas son diméricas (Cuadro 1). Posiblemente las mismas características de la proteína que dan como resultado esta estructura cuaternaria (de dímero) sean las causantes de la sobreestimación de la masa molecular, aún bajo las condiciones reductoras y desnaturalizantes que se mantuvieron en el sistema de electroforesis empleado.

La ausencia de mercaptoetanol en el amortiguador de muestra permitió la formación de enlaces disulfuro intrasubunidad en la enzima de *Pseudomonas* (Figura 2 A del Artículo 1). Este resultado es similar al encontrado cuando se usó el reactivo bifuncional glutaraldehído, en donde también apareció una banda con una aparente menor masa molecular (Figura 3 del Artículo 1).

La determinación de la masa molecular de la proteína nativa utilizando entrecruzamiento con glutaraldehído y cromatografía de filtración en gel también resultó ser incorrecta. Un ejemplo de esto último se presenta en la Figura 8, en donde la separación de la BADH en una columna de Superdex 200 HR 10/30 arrojó un valor de 184 kDa. En forma similar, Nagasawa *et al.*, sobreestimaron la masa molecular de esta enzima (145 kDa) en Sephadex G200. Fue necesario utilizar la técnica de sedimentación al equilibrio en una centrífuga analítica (Figura 4 del Artículo 1) para saber que la BADH de *P. aeruginosa* es un homodímero de 109 kDa (ver Cuadro 1 para una comparación con otras BADHs).

Cuadro 1. Características fisicoquímicas de las BADHs purificadas hasta ahora.

Característica	Fuente biológica								
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>X. translucens</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. didymum</i>	Hoja de <i>A. hypochondriacus</i>	Hoja de <i>S. oleracea</i>	Hígado de humano (citoplásmica)	Hígado de rata (mitocondrial)
No. de subunidades	2 (nd)	2	4	4	4	2	2	4	4
Masa molecular por subunidad(kDa).	a 61 (nd) b 53 (nd)	62 54	50 nd	55 53	58 nd	63 55	63 54	54 54	59 nd
Masa molecular de la proteína nativa (kDa)	c 139 (145) d 109 (nd)	nd 109	200 nd	232 nd	220 nd	125 nd	111 nd	219 nd	255 nd
Número de aminoácidos por subunidad	e 583 (nd) b 486 (nd)	nd 490	510 nd	511 489	nd nd	nd 501	nd 497	nd 493	nd nd
Presencia de nucleótidos unidos.	No (No)	nd	No	No	nd	No	nd	Si	nd
Punto isoelectrico	5.1 (5.1)	nd	nd	nd	nd	nd	5.7	5.3	5.4

Valores obtenidos por: **a**, electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS; **b**, el análisis de la secuencia nucleotídica del gen respectivo; **c**, cromatografía por filtración en gel o electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente de porosidad (sin SDS); **d**, centrifugación con gradiente de densidad o por sedimentación en equilibrio; **e**, análisis del contenido de aminoácidos. Los datos se tomaron de las siguientes fuentes: *P. aeruginosa* (del Artículo 1 y entre paréntesis los publicados por Nagasawa et al., 1976); *B. subtilis* (Boch et al., 1996 and 1997); *X. translucens* (Mori et al., 1992); *E. coli* (Falkenberg and Strom 1990; Lamark, et al., 1991); *C. didymum* (Mori et al., 1980); hoja de *A. hypochondriacus* (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1994; Legaria et al., 1998); hoja de *S. oleracea* (Weretlinsky and Hanson, 1989 y 1990); hígado de humano (Kurys et al., 1989 y 1993; Chern and Pietruszko, 1995); hígado de rata (Chern and Pietruszko, 1999); (nd), no determinado.

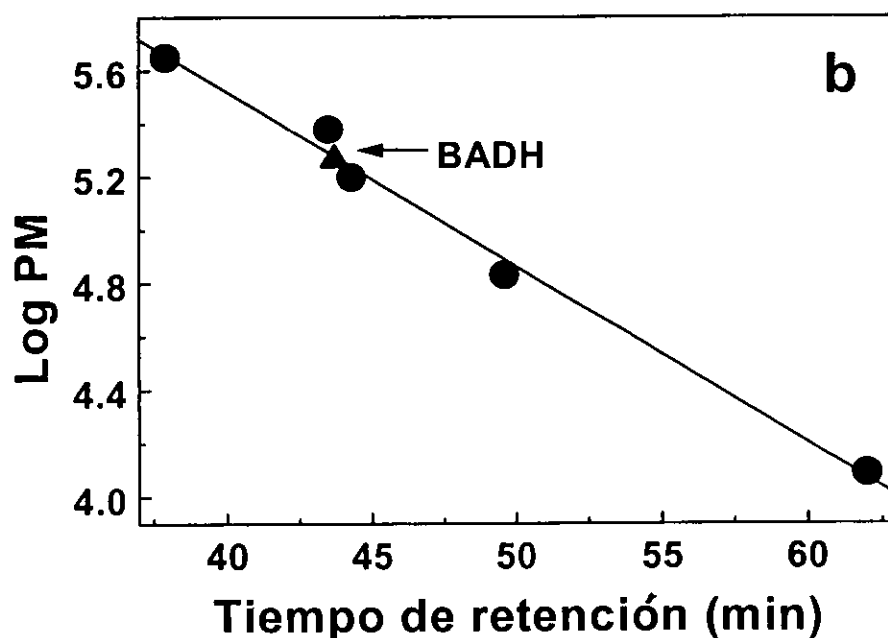
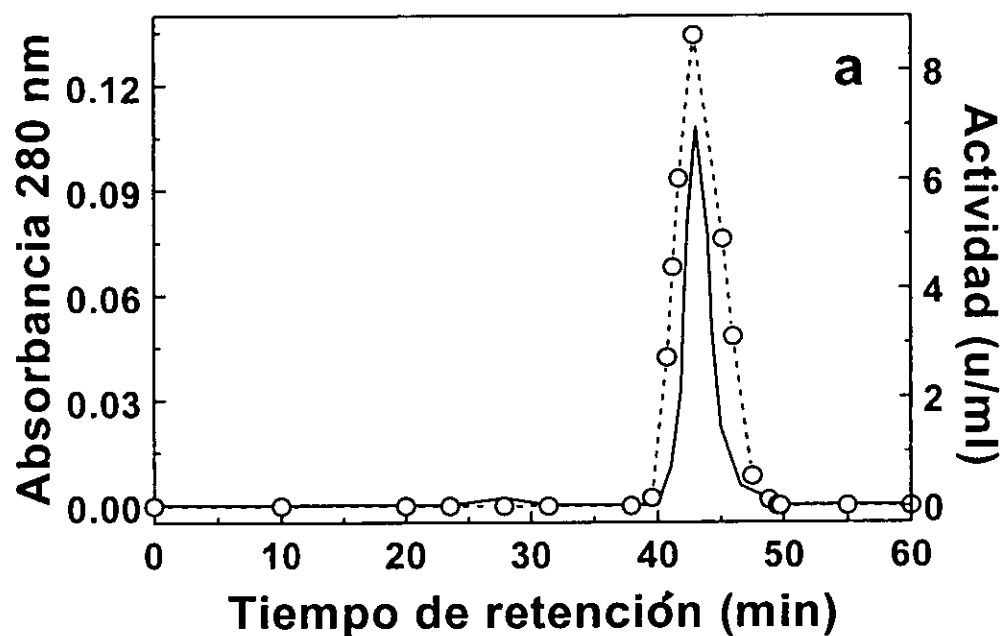


Figura 8. Determinación de la masa molecular de la BADH por cromatografía de filtración en una columna de Superdex 200 HR 10/30. (a) Perfil de la elución de BADH (0.25 mg/ml). Se determinó la absorbancia a 280 nm (línea sin símbolos) y la actividad de BADH (línea con círculos). La calibración de la columna se realizó con los siguientes marcadores de peso molecular: ferritina (450,000), catalasa (de hígado de bovino) (240,000), aldolasa (de músculo de conejo) (158,000), BSA (68,000) y citocromo c (12,5000). (b) Gráfica del log del peso molecular contra el tiempo de retención en la columna. Los marcadores se identifican con (●) y BADH con (▲).

El punto isoeléctrico encontrado para la enzima nativa y su subunidad (5.1 en ambos casos, Figura 2B, Artículo I) es reflejo de su alto contenido de residuos ácidos (Cuadro 2), calculado a partir de la composición de aminoácidos obtenida directamente de la proteína o de la secuencia derivada del gen de BADH. En el Cuadro 2 se observa también la alta similitud en el contenido de aminoácidos de las BADHs de distintas bacterias. Refiriéndonos al porcentaje de los distintos tipos de aminoácidos que poseen las BADHs (parte inferior del Cuadro 2), podemos observar que no existen grandes diferencias entre las 6 determinaciones (máximo un 10% entre los residuos hidrofóbicos valorada por el contenido de aminoácidos y desde la secuencia del gen de BADH). No obstante, al analizar en forma individual los aminoácidos se encuentra un error de hasta 37% y 36% en el caso de la determinación de alanina y glicina respectivamente, mientras que en *E. coli* el error llega sólo a un 19 y 14% para la arginina y la glicina. Con base en esto, podemos considerar que la determinación en el contenido de aminoácidos de la enzima de *P. aeruginosa* realizada en el Biochemistry Resource Laboratory of the W.W. Keck Foundation, New Haven, Conn, es inexacta.

La secuenciación de los primeros 21 aminoácidos del extremo amino de la BADH de *P. aeruginosa* se realizó en la misma institución antes mencionada. Esta secuencia se utilizó después para buscar en las bases de datos de Internet otras secuencias que fueran homologas a ella. Una de las secuencias con 100% de identidad con la nuestra pertenecía a la base de datos del "*Pseudomonas* Genome Project". Hicimos la solicitud al Dr. Richard L. Garber, Director de la Research Collaborations Pathogenesis Corporation, Seattle, USA, y él gentilmente nos envió la secuencia de la proteína y del gen que la codifica. Con la secuencia aminoacídica se realizó un análisis de alineamiento con las BADHs que hasta ahora han sido secuenciadas, utilizando el programa Building Clustalw Aligment (<http://www.bork.embl-heidelberg.de/cgi/aligment>). El resultado se presenta en la Figura 9. Dicho alineamiento arrojó un 76% de identidad entre la BADH de *P. aeruginosa* y la de *E. coli* (Boyd *et al.*, 1995), 52% con la de *S. meliloti*, (Pocard *et al.*, 1997), 51% con la de hígado humano (Kurys *et al.*, 1993), 49% con la de hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998), 42% con la de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996), 41% con la de *A. hypochondriacus* (Legaria *et al.*, 1998), 39% con las de *O. sativa* (Nakamura *et al.*,

Cuadro 2. Comparación del contenido de aminoácidos de la BADH de diferentes bacterias.

Aminoácidos	% ^a	Número de residuos por subunidad					
		<i>P. aeruginosa</i>		<i>E. coli</i>		<i>S. meliloti</i> ^c	<i>B. subtilis</i> ^c
Asx ^f	7.6	37 ^b	41 ^d	43 ^c	40 ^e	39	44
Glx ^f	11.9	58	77	50	57	47	6
Thr	6.2	30	35	31	32	30	21
Ser	6.0	29	32	30	33	20	28
Pro	4.1	20	27	20	19	29	20
Gly	9.3	45	61	46	48	53	44
Ala	10.5	51	70	55	57	63	48
Val	8.6	42	54	40	41	38	33
Met	2.3	11	11	13	14	10	7
Ileu	5.6	27	33	30	30	30	40
Leu	7.6	37	49	35	38	37	38
Tyr	2.9	14	17	14	14	12	10
Phe	3.5	17	23	18	19	21	22
Lys	3.7	18	16	21	22	23	34
His	1.2	6	5	6	6	6	6
Arg	7.0	34	26	26	31	22	20
Cys	0.8	4	6	5	7	5	4
Trp	1.2	6	nd ^g	6	3	4	8
Total		486	583	489	511	489	492
Tipo de aminoácido (%)							
Ácido		19.5	20.2	19.0	19.0	17.6	22.2
Básico		11.9	8.1	10.8	11.5	10.4	12.2
Hidrofóbico		41.6	45.8	44.4	44.0	47.4	43.9
Aromático		7.6	6.9	7.8	7.0	7.6	8.1

^aPorcentaje respecto al total de aminoácidos obtenido de ^bla secuencia del gen de *P. aeruginosa* (Genome *Pseudomonas* Project). ^cLos datos de estas columnas fueron obtenidos de la secuencia del gen respectivo (Boyd et al., 1991; Pocard et al., 1997; Boch et al., 1996). Valores estimados a partir del análisis del contenido de aminoácidos, asumiendo una masa molecular de la subunidad de ^d60.9 kDa (artículo I) y de ^e55 kDa (Falkenberg y Strom, 1990). ^fLos valores incluyen las amidas correspondientes. ^g nd, No determinado.

Figura 9. Alineamiento múltiple de la secuencia de aminoácidos de doce BADHs, comenzando con la de *P. aeruginosa*. A la derecha se muestra el número que corresponde al último aminoácido de cada renglón, dentro de cada secuencia individual. Los residuos conservados en todas las BADHs están marcados en la parte inferior de cada bloque con un #. Los números de acceso al servidor de Swiss-Prot (<http://expasy.ch/cgi-bin/get-sprot-entry?> seguido por el número de acceso) son, en orden descendente a partir de la enzima de *E. coli*: P17445, P54222, P49189, P56533, P17016, O04895, O24174, P17202, P28237, P42757 Y Q40024 (continúa en la siguiente hoja).

<i>P. aeruginosa</i>	-----	---MARFEEQ	KLYIGGRYVE	ASSG--ATFE	TINPANGEVL	AKVQRASRED	45
<i>E. coli</i>	-----	----SRMAEQ	QLYIHGGYTS	ATSG--RTFE	TINPANGNVL	ATVQAAGRED	44
<i>S. meliloti</i>	-----	----MRAQPKA	SHFIDGEYVE	DAAG--TVIE	SIYPATGERVI	ARLHAATPGI	45
<i>H. sapiens</i>	-----M	STGTFFVVSQP	LNYRGGG-AA	GAGGRSGTEK	AFEPATGRVI	ATFTCSGEKE	49
<i>G. callarias</i>	AQLVDSMP	STGSVVVTDD	LNYWGGRRIK	SKDG-ATTEP	VFEPATGRVL	CQMVPCGAE	59
<i>E. subtilis</i>	-----	-----MSQ	TLFIDGEWIS	AEKE-OQIRS	IINPFNQEEI	ATVSEGGRED	41
<i>A. hypochondriacus</i>	-----	MAIR--VPSR	QLFIDGEWRE	PIKK--NRIP	IINPSTEEII	GDI PAATAED	46
<i>O. sativa</i>	-----	MAAPSAIPRR	GLFIDGGWRE	PSLG--RRLP	VVNPAETEATI	GDI PAATAED	48
<i>S. oleracea</i>	-----	MAFP--IPAR	QLFIDGEWRE	PIKK--NRIP	VINPSTEEII	GDI PAATAED	46
<i>B. vulgaris</i>	-----	MSMP--IPSR	QLFIDGEWRE	PIKK--NRIP	IINPSTEEII	GDI PAGSSED	46
<i>A. hortensis</i>	-----	MAFP--IPAR	QLFIDGEWRE	PLLK--NRIP	IINPSTEEII	GDI PAATAED	46
<i>H. vulgare</i>	-----	MAAPPAIPRR	GLFIDGGWRE	PTLG--RHIP	VINPATEDTI	GDI PAATAED	48
			#		#		
<i>P. aeruginosa</i>	VERAVQSAVE	GQK-----VW	AAMTAMQSR	ILRRAVDILR	ERDELAALE	TLDTGKPLAE	100
<i>E. coli</i>	VDRAVKSAQQ	GQK-----IW	ASMTAMERSR	ILRRAVDILR	ERDELAKLE	TLDTGKAYSE	99
<i>S. meliloti</i>	VEKAIAAAAR	AQP-----EW	AAMSPTARGR	ILKRAAELMR	QLNRELSELE	TLDTGKPIQE	100
<i>H. sapiens</i>	VNLAVQNAKA	AFK-----IW	SQKSGMERC	ILLEAARIIR	EREDEIATME	CINNGKSIPE	104
<i>G. callarias</i>	VDQAVQSAQA	AYL-----KW	SKMAGIERSR	VMLEAARIIR	ERRDNIAKLE	VINNGKTITE	114
<i>B. subtilis</i>	AIKAIAAAARR	AFDKGE---W	SSLGLGERGK	IVLKIAELIR	RDLEELAELE	SLDTGKTLLE	98
<i>A. hypochondriacus</i>	VELAVAAAARR	ALKRKNKGEDW	ASASGAHRAK	YLRAIAAKIT	EKKDYFAKLE	AMDCGKPLDE	106
<i>O. sativa</i>	VELAVSAARD	AFGRDGGRRHW	SRAPGAVRAK	YLKAIAAKIK	DKKSYLALLE	TLDSGKPLDE	108
<i>S. oleracea</i>	VEVAVVAARR	AFRRNN---W	SATSGAHRAT	YLRAIAAKIT	EKKDHFVKLE	TIDSGKPFDE	103
<i>B. vulgaris</i>	IEVAVAAAARR	ALKRKNKREW	AATSGAHRAR	YLRAIAAKVT	ERKDHFPKLE	TIDSGKPFDE	106
<i>A. hortensis</i>	VEVAVVAARK	AFKRNKGR-D	WAALWSHRAK	YLRAIAAKIT	EKKDHFVKLE	TLDSGKPRDE	105
<i>H. vulgare</i>	VELAVAAGGP	VLARRR-EPW	ARASGATRAK	YLNIAIAAKIT	GKIAYLALLE	TVDSGKPKDE	107
	#		#		#	##	#
<i>P. aeruginosa</i>	TRSVDIIVTGA	DVLEY---YA	GLVPAIE---	GEQIPLRET-	SFVYTRREPL	GVVAGIGAWN	153
<i>E. coli</i>	TSTVDIIVTGA	DVLEY---YA	GLIPALE---	GSQIPLRET-	SFVYTRREPL	GVVAGIGAWN	152
<i>S. meliloti</i>	TIVADPTSGA	DSPEF---FG	GVAPAALN--	GDYIPLGG--	DFAYTKRVPL	GVCVIGAWN	153
<i>H. sapiens</i>	AR-LDIDISW	QCLEY---YA	GLAASMA---	GEHIQLPGG-	SFGYTRREPL	GVCVIGAWN	156
<i>G. callarias</i>	AE-YDIDAAW	QCIEY---YA	GLAPTL---	GQHIQLPGG-	AFAYTRREPL	GVCAGILAWN	166
<i>B. subtilis</i>	SK-ADMDDIA	NVFQY---YA	GLADKDGGE-	--IISPIPD	SESKIIREPI	GVCCQITPWN	151
<i>A. hypochondriacus</i>	AA-RDIDDVA	GCFEY---YA	DQAEALDAKQ	KAPIALPMDT	FKSHVLRQPI	GVVGLISPWN	162
<i>O. sativa</i>	AA-GDMEDVA	ACFEY---YA	DLAEALDGKQ	RAPISLPMEN	FESYVLKEPI	GVVGLITPWN	164
<i>S. oleracea</i>	AV-LDIDDVA	SCFEY---FA	GQAEALDGKQ	KAPVTLPMER	FKSHVLRQPL	GVVGLISPWN	159
<i>B. vulgaris</i>	AV-LDIDDVA	TCFEY---FA	GQAEAMDAKQ	KAPVTLPMER	FKSHVLRQPI	GVVGLITPWN	162
<i>A. hortensis</i>	AV-LDIDDVA	TCFEYFEYFA	GQAEALDAKQ	KAPVTLPMER	FKSHVLRQPI	GVVGLISPWN	164
<i>H. vulgare</i>	AV-ADMDDVA	ACFEY---YA	ALAEALDGKQ	HAPISLPMEE	FKTYVLRKEPI	GVVGLITPWN	163
	#				#	##	# #
<i>P. aeruginosa</i>	YPVQIALWKS	APALAAAGNAM	IFKPSEVTPL	TALKLAEIYT	EAGVPDGVFN	VLTGSGREVG	213
<i>E. coli</i>	YPIQIALWKS	APALAAAGNAM	IFKPSEVTPL	TALKLAEIYS	EAGLPDGVFN	VLPVGAETG	212
<i>S. meliloti</i>	YPQIACWKG	APALVAGNAM	VFKPSENTPL	GALKIAEILI	EAGLPKGLFN	VIQG-DRATG	212
<i>H. sapiens</i>	YPFQIASWKS	APALACGNAM	VFKPSPFTPV	SALLLAEIYS	EAGVPPGLFN	VVQG-GAATG	215
<i>G. callarias</i>	YPFMIAAWKC	APALACGNAM	VFKPSPMTPV	TGVILAEIFH	EAGVPVGLVN	VVQG-GAETG	225
<i>B. subtilis</i>	YPLLQASWKI	APALAAAGNTI	VMKPSEITPL	TTIKVFKLME	EAGVPPKGVN	EAGVPPKGVN	211
<i>A. hypochondriacus</i>	YPLLMTWKV	APALAAAGCSA	VLKPSELASV	TCLELAEVCR	EVGLPPGVLN	ILTLGLPEAG	222
<i>O. sativa</i>	YPLLMTWKV	APALAAAGCTA	VLKPSELASL	TCLELGGICA	EIGLPPGVLN	IITGLGTEAG	224
<i>S. oleracea</i>	YPLLMTWKI	APALAAAGCTA	VLKPSELASV	TCLEFGEVCN	EVGLPPGVLN	ILTLGLPDAG	219
<i>B. vulgaris</i>	YPLLMTWKI	APALAAAGCTA	VLKPSELASI	TCLEFGEVCN	EVGLPPGVLN	IVTLGLPDAG	222
<i>A. hortensis</i>	YPLLMDTWKI	APALAAAGCTT	VLKPSELASV	TCLEFGEVCN	EVGLPPGVLN	ILTLGLPDAG	224
<i>H. vulgare</i>	YPLLMTWKV	APALAAAGCTA	VLKPSELASL	TCLELGAICE	EIGLPPGVLN	IITGLGPDAG	223
	##	##	####	#	###	#	#

<i>P. aeruginosa</i>	QWLTEHPLIE	KISFTGGTST	GKKVMASASS	SSLKEVTMEL	GGKSPLIIFP	DA-DLDRAAD	272
<i>E. coli</i>	QYLTEHPGIA	KVSFTGGVAS	GKKVMANSAA	SSLKEVTMEL	GGKSPLIVFD	DA-DLDDAAD	271
<i>S. meliloti</i>	PLLVNHPDVA	KVSLTGSVPT	GKKVAGAAAA	E-LKHVTMEL	GGKSPLIVFD	DA-DLESAIG	270
<i>H. sapiens</i>	QFLCQHPDVA	KVSFTGSVPT	GKMIMEMSAK	G-IKPVTLEL	GGKSPLIIFP	DC-DMNNAVK	273
<i>G. callarias</i>	SLLCCHPNVA	KVSFTGSVPT	GKKVMEMSAK	T-VKHVTLEL	GGKSPLIIFK	DC-ELENAVR	283
<i>B. subtilis</i>	DELAVNKDVD	LISFTGGIET	GKKIMRAASG	N-VKKIALEL	GGKPNPVIKF	DA-DLEVAVD	269
<i>A. hypochondriacus</i>	GPLACHPDVD	KVAFTGSTAT	GSKVMSSAAQ	L-VKPVTLEL	GGKSPLIVFE	DV-DLDKAAE	280
<i>O. sativa</i>	APLASHPHVD	KIAFTGSTET	GKRIMITASQ	M-VKPVLEL	GGKSPLIVFD	DV-DIDKAVE	282
<i>S. oleracea</i>	APLVSHPDVD	KIAFTGSSAT	GSKVMASAAQ	L-VKPVTLEL	GGKSPIVFE	DV-DIDKVEE	277
<i>B. vulgaris</i>	APLAHPDVID	KVAFTGSSAT	GSKVMASAAQ	L-VKPVTLEL	GGKSPIVFE	DV-DIDQVVE	280
<i>A. hortensis</i>	APIVSHPDID	KVAFTGSSAT	GSKVMASAAQ	L-VKPVTLEL	GGKSPIVFE	DI-DIETAVE	282
<i>H. vulgare</i>	APIASHPHVD	KIAFTGSTAT	CKTMTAAAQ	M-VKPVLEL	GGKSPLVTFD	DVADIDKAVE	282
		##	#	#	##	### #	#

<i>P. aeruginosa</i>	IAMVANFFSS	GQVCTNGTRV	FIHRSQARF	EAKVLERVQR	IRLGDQPQEN	TNFGPLVSFP	332
<i>E. coli</i>	IAMMANFFSS	GQVCTNGTRV	FVPAKCKAAF	EQKILARVER	IRAGDVFPDQ	TNFGPLVSFP	331
<i>S. meliloti</i>	GAMLGNFYST	GQVCSNGTRV	FVQRKIKEPF	LARLKERTEA	IVIGDPLDEA	TQLGPMVAAA	330
<i>H. sapiens</i>	GALMANFLTQ	GQVCCNGTRV	FVQKEILDKF	TEEVVKQTQR	IKIGDPLLED	TRMGPLINRP	333
<i>G. callarias</i>	GALMANFLTQ	GQVCTNGTRV	FVQREIMPQF	LEEVVKRTKA	IVVGDPLLTE	TRMGGLISKP	343
<i>B. subtilis</i>	QALNAVFFHA	GQVCSAGSRL	LVEDAIHQDF	LAELVKRAKR	IKLNGGFHAE	TESGPLISAE	329
<i>A. hypochondriacus</i>	WTAFCGFWTN	GQICSATSRL	LVHESIAAEF	LDRLVKWCKN	IKISDPFEEG	CRLGPVVSKE	340
<i>O. sativa</i>	WAMFGCFANA	GQVCSATSRL	LLHEKIAKRF	LDRLVAWAKS	IKISDPLEEG	CRLGSVVSEG	342
<i>S. oleracea</i>	WTIFGCFWTN	GQICSATSRL	LVHESIAAEF	VDLVKWKTKN	IKISDPFEEG	CRLGPVVISKG	337
<i>B. vulgaris</i>	WTMFGCFWTN	GQICSATSRL	LVHESIAAEF	IDRLVKWTKN	IKISDPFEEG	CRLGPVVISKG	340
<i>A. hortensis</i>	WTLFGVFWTN	GQICSATSRL	LVHESIAAEF	VDRMVKWKTKN	IKISDPFEEG	CRLGPVVISKG	342
<i>H. vulgare</i>	WPMLGCFFNG	GQVCSATSRL	LLHEKIAEPF	LDRLVEWAKN	IKISDPLEEG	CRLGSVVISKG	342
	#	## #	#	#	#	#	#

<i>P. aeruginosa</i>	HMESVLGYIE	SGKAQKARLL	CGGERVT--D	GAFGKGAYVA	PTVFTDCRDD	MTIVREEIFG	390
<i>E. coli</i>	HRDNVLRVIA	KGKEEGARVL	CGGDVLIK--G	DGFDNGAWVA	PTVFTDCSDG	MTIVREEIFG	389
<i>S. meliloti</i>	QRDKVFSYIG	KGKAEGARVL	TGGGIPN---	NVSGEGTYIQ	PTVFADTDD	MTIAREEIFG	387
<i>H. sapiens</i>	HLERVLFVFK	VAKEQGAKLV	CGGDIYVPED	PKLKDGYMYR	PCVLNCRDD	MTCVKEEIFG	393
<i>G. callarias</i>	QLDKVLGFVA	QAKKEGARVL	CGGEPLTPSD	PKLKNGYFMS	PCVLNCRDD	MTCVKEEIFG	403
<i>B. subtilis</i>	HRAKVEKYVE	IGIEEGAKLE	TGGKRPED--	PELQNGPFYE	PTIFSNCSND	MRIVQEEVFG	387
<i>A. hypochondriacus</i>	QYQKIMKFIS	TAKSEGATIL	CGGSRPE---	-HLKKGYYVE	PTIISDVSTS	MQIWREEVFG	396
<i>O. sativa</i>	QYQKIMKFIS	TARCEGATIL	YGGARPE---	-HLKKGFFIE	PTIITNVSTS	MQIWREEVFG	398
<i>S. oleracea</i>	QYDKIMKFIS	TAKSEGATIL	YGGSRPE---	-HLKKGYYIE	PTIVTDISTS	MQIWKEEVFG	393
<i>B. vulgaris</i>	QYDKIMKFIS	TAKSEGATIL	CGGSRPE---	-HLKKGYYIE	PTIISDISTS	MQIWREEVFG	396
<i>A. hortensis</i>	QYDKIMKFIS	TAKSEGATIL	CGGSRPE---	-HLKKGYYIE	PTIITDITTS	MQIWKEEVFG	398
<i>H. vulgare</i>	QYEQIKKFIS	TARSEGATIL	HGGDRPK---	-HLGKGFIE	PTINTGVSTS	MQIWREEVFG	398
		#	##	#	#	#	##

<i>P. aeruginosa</i>	PVMSILVYDD	EDEAIRRAND	TEYGL---V	NQDLARGHRA	IHRLEAGICW	INTWGESPAAE	446
<i>E. coli</i>	PVMSILTYES	EDEVIRRAND	TDYGLAAGIV	TADLNRAHRV	IHQLEAGICW	INTWGESPAAE	449
<i>S. meliloti</i>	PVMCVLDFDD	EVEVIARANA	TEFGLSAGVF	TADLTRAHRV	ADRLEACTLW	INTYNLCPVE	447
<i>H. sapiens</i>	PVMSILSFDT	EAEVLERAND	TTFGLAAGVF	TRDIQRAHRV	VAELQAGTCF	INNYNVSPVE	453
<i>G. callarias</i>	PVMSVLPDFT	EEEVLRANN	TTFGLASGVF	TRDISRAHRV	AANLEACTCY	INTYSISPVE	463
<i>B. subtilis</i>	PVLTVEFFSS	EEEVIELAND	TIYGLAGAVW	SKDIEKCERV	AARLRMTVW	INDFHPYFAQ	447
<i>A. hypochondriacus</i>	PVLCQKTFGS	EDEAIELAND	TQYGLGAAVL	SKDLRRCERI	TKALEVGAVW	VNCSQPCFTQ	456
<i>O. sativa</i>	PVICVKEFRT	EREAVELAND	THYGLAGAVI	SNDLRCERI	SKAIQSGIVW	INCSQPCFVQ	458
<i>S. oleracea</i>	PVLCVKTFSS	EDEAIALAND	TEYGLAAAVF	SNDLRCERI	TKALEVGAVW	VNCSQPCFVQ	453
<i>B. vulgaris</i>	PVLCVKTFSS	EDEALELAND	TEYGLASAVF	SKDLRRCERV	SKLLESAGAVW	VNCSQPCFVH	456
<i>A. hortensis</i>	PVICVKTFKT	EDEAIELAND	TEYGLAGAVF	SKDLRRCERV	TKALEVGAVW	VNCSQPCFVH	458
<i>H. vulgare</i>	PVICVKVFKT	ESEAVELAND	THYGLAGGVI	SDDLRCERI	AKVIHSGIVW	KNCSQPTLVQ	458
	##	##	##	#	#	#	#

<i>P. aeruginosa</i>	MPVGGYKQSG	VGRENGLTTL	AHYTRIKSVQ	VELG--DYAS	VF-----	486	
<i>E. coli</i>	MPVGGYKHSG	IGRENGVMTL	QSYTQVKSIO	VEMA--KFQS	IF-----	489	
<i>S. meliloti</i>	IPFGGSKQSG	FGRENSVAAL	NHYTELKTVY	VGMG--PVEA	PY-----	487	
<i>H. sapiens</i>	LPFGGYKKS	FGRENGRVTI	EYYSQKLTVC	VEMG--DVES	AF-----	493	
<i>G. callarias</i>	VPFGGYKMSG	FGRENGQATV	DYYSQKLTVI	VEMG--DVDS	LF-----	503	
<i>B. subtilis</i>	APWGGYKQSG	FGRELKIGL	BEYTEVKHVV	RNTK-PAAVN	WFNS----	490	
<i>A. hypochondriacus</i>	APWGGTKRSG	FGRELGEWGI	ENYLNKQVT	RDTSTDEPWG	WYKSP---	501	
<i>O. sativa</i>	APWGGNKRSG	FGRELQWGL	DNYLSVKQVT	KYCS-DEPYG	WYRPPSKL	505	
<i>S. oleracea</i>	APWGGIKRSG	FGRELGEWGI	QNYLNKQVT	QDIS-DEPWG	WYKSP---	497	
<i>B. vulgaris</i>	APWGGIKRSG	FGRELGEWGI	ENYLNKQVT	SDIS-NEPWG	WYKSP---	500	
<i>A. hortensis</i>	APWGGVKRSG	FGRELGEWGI	ENYLNKQVT	SDIS-DEPWG	WYKSP---	502	
<i>H. vulgare</i>	APWGGNKRSG	FGRELQWGL	ENYLSVKQVT	RYCK-DELYG	WYQRP SKL	505	
	#	## #	##	#	#	#	#

1997) y *S. oleracea* (Weretilnik y Hanson, 1990) y 38% con las de *B. vulgaris* (McCue y Hanson, 1992), *Atriplex hortensis* (Xiao *et al.*, 1995) y *H. vulgare* (Ishitani *et al.*, 1995). Desafortunadamente la enzima de *X. translucens*, el microorganismo taxonómicamente más cercano a *P. aeruginosa*, no ha sido secuenciado más allá de sus primeros 35 aminoácidos del extremo amino terminal. En este fragmento de la cadena polipeptídica ambos microorganismos presentaron un 65% de identidad, mientras que con el mismo fragmento de la enzima de *E. coli* la de *P. aeruginosa* tiene un 69% de identidad. En un estudio previo (Sage *et al.*, 1997), cuyo objetivo era obtener mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en la inducción por colina de fosfolipasa C, se encontró que una de las mutantes no pudo utilizar colina como fuente de carbono y nitrógeno, ni presentó actividad de BADH. El análisis de un fragmento contiguo al lugar de la mutación mostró que codificaba para un péptido de 44 aminoácidos, con una identidad del 84% con la BADH de *E. coli*. Este péptido fue 100% idéntico al fragmento de nuestra proteína que va de Ile88 a Glu121 (Figura 9).

El tamaño de todas las BADHs es similar y está en el intervalo de 486 a 505 aminoácidos. El número de estos residuos conservados entre las doce enzimas comparadas en la Figura 10 es de 88 (marcados con un #) y entre ellos están la base general (Glu252, en la proteína de *P. aeruginosa*) y el residuo nucleofílico del sitio activo (Cys286) propuestos para las aldehído deshidrogenasas (Farrés *et al.*, 1995; Weiner *et al.*, 1995; Wang y Weiner, 1995). También están conservados la Lys176 y el Glu386, en la secuencia de *P. aeruginosa*, que se ha dicho se involucran en la estabilización del estado de transición, uniéndose a la ribosa del NAD⁺ (Sheikh *et al.*, 1997; Ni y Weiner, 1997). La Gly230, que pertenece a una región GXXXXG conservada en las aldehído deshidrogenasas (Hempel *et al.*, 1993), también está presente en todas las BADHs analizadas aquí, y podría ser importante en la unión con la coenzima, como se ha propuesto (Vedadi *et al.*, 1997). La enzima BADH de *P. aeruginosa* necesita K⁺ y NADP⁺ para permanecer estable ante diferentes condiciones de inactivación (ver tres párrafos adelante). Hasta ahora no se había reportado el requerimiento por el ión metálico para ninguna BADH. Para el caso de la piruvato cinasa de músculo de conejo se sabe que el Glu 117, que corresponde al Glu 100 en la secuencia de la BADH de *P. aeruginosa* (Figura 9), es necesario para la unión del potasio (Laughlin y Reed, 1997).

De la misma forma, se ha determinado que el residuo Arg 46 de la G6PDH de *L. mesenteroides*, Arg 43 en la BADH de *P. aeruginosa*, juega un papel en la unión del NADP⁺, pero no en la del NAD⁺ (Levy *et al.*, 1996). En un análisis de alineamiento de la secuencia de nuestra enzima con las de las G6PDHs de *L. mesenteroides* y de *P. aeruginosa* (con los números de acceso al servidor de Swiss-Prot P11411 y O68282, respectivamente), se encontró que esta arginina está conservada en las tres proteínas, lo que sugiere que en esta última bacteria dicho residuo podría involucrarse también en la unión específica del NADP⁺. Es necesario llevar a cabo experimentos de mutación en los sitios que codifican para estos aminoácidos con el fin de conocer si se involucran en las funciones mencionadas.

A pesar de la relativa alta identidad que tiene la enzima de *P. aeruginosa* con la de otras especies, el anticuerpo policlonal obtenido contra ella no interactuó con la enzima de *E. coli* ni con la de *A. hypochondriacus*. Este anticuerpo se utilizó posteriormente para evidenciar la sobreexpresión de la BADH de *P. aeruginosa* en *E. coli*, en donde se clonó el gen *badh* de la primer bacteria (ver más adelante).

La enzima BADH purificada no presenta ninguna coenzima unida, como lo demuestra el espectro obtenido en la región visible. La unión *in vitro* del NADP⁺, detectada por fluorescencia, extinguió en un 30% el máximo de emisión a 332 nm (Figura 5, Artículo 1) y provocó un pequeño corrimiento de éste (2 nm) hacia la región visible. La emisión a 332 nm parece corresponder a un Trp localizado en el interior de la estructura proteica (tipo I) (Strasser *et al.*, 1998) y el apagamiento podría ser explicado por una transferencia de energía de este residuo al nucleótido unido (Forster, 1948). El corrimiento de 2 nm hacia la región visible podría deberse a un cambio en la conformación de la proteína provocado por la unión de la coenzima.

Como mencionamos previamente, la enzima almacenada a -20 °C fue estable durante más de un año, tiempo durante el que se hizo el seguimiento. El medio en el que se almacenó contenía: amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.9, EDTA 0.1 mM, sacarosa 20% (p/v) y KCl 25 mM. La enzima mostró una pérdida rápida de su actividad al exponerla a 40 °C, a una dilución o al amortiguador Tris-HCl (Figura 7, Artículo 1). En todos estos casos la presencia del NADP⁺ fue suficiente para protegerla, requiriendo únicamente en el caso de la inactivación en Tris-HCl de un efecto sinérgico del K⁺. En otro estudio se había evidenciado una protección por el NADP⁺ y el NAD⁺ ante la

inactivación térmica de distintas enzimas (Park y Kim, 1998). Cabe mencionar, sin embargo, el trabajo en el que la NADP⁺-malato deshidrogenasa del citoplasma de la corteza adrenal del bovino se inestabilizó aún más cuando el estrés térmico se dio en presencia de NADP⁺ o de malato (Senkevich *et al.*, 1986).

El modelo que se propone en el Artículo I., $A \rightleftharpoons I \longrightarrow I'$, en el que A es la forma activa de la enzima que se equilibra con I, una forma inactiva de la enzima, la que a su vez se convierte por una aparente reacción irreversible en I', otra forma inactiva, tiene sustento en los siguientes resultados. A los 10 min de haberse iniciado la inactivación a 40 °C la forma I puede revertirse hasta A si se le coloca a 30 °C (Figura 7A, Artículo I). Sin embargo, si el cambio de temperatura se aplica hasta los 30 min de iniciada la inactivación el efecto no se revierte (se ha formado I') (datos no mostrados). Un resultado más que apoya la existencia de estas diferentes formas proteicas es el que se muestra en la Figura 10. Antes de iniciar la inactivación a 40 °C la enzima presenta una emisión máxima a 331 nm, pero 10 min después de aumentar la temperatura se registra una disminución del 2% en la emisión, sin cambio en la longitud de onda. A los 30 min de inactivación el máximo de emisión se desplaza de 331 a 334 nm y disminuye un 2% más.

El apagamiento en la emisión podría explicarse por un rearrreglo en la estructura de la proteína que lleva a la formación de I. Los cambios en la estructura tridimensional son menores, por lo que el regreso a 30 °C puede dar lugar a una reconversión a A. El desplazamiento a 334 nm a los 30 min parece resultar de un cambio estructural más drástico que no permite el replegamiento de la BADH, pero si la formación de I'.

Refiriéndonos a la inactivación de la BADH de *P. aeruginosa* en amortiguador Tris-HCl, podemos señalar que es la ausencia de iones K⁺, mas que un efecto *per se* del Tris, la que lleva a una inestabilidad de la enzima. Durante la inactivación en Tris se descarta una posible oxidación de los grupos sulfhidrilos esenciales, ya que la adición de DTT 5 mM al medio de ensayo no redujo la velocidad de inactivación. En amortiguador Tris, la presencia de KCl, mas no de NaCl (concentraciones equimolares), estabilizó parcialmente a la enzima. El K⁺ protegió totalmente a la enzima cuando se utilizó junto con PO₄³⁻ (amortiguador de fosfato de potasio), mientras que con fosfato de sodio se observó inactivación, aunque a menor velocidad que con el amortiguador Tris (datos no mostrados). En el amortiguador Tris-HCl el KCl (25 mM) o el NADP⁺ (0.5

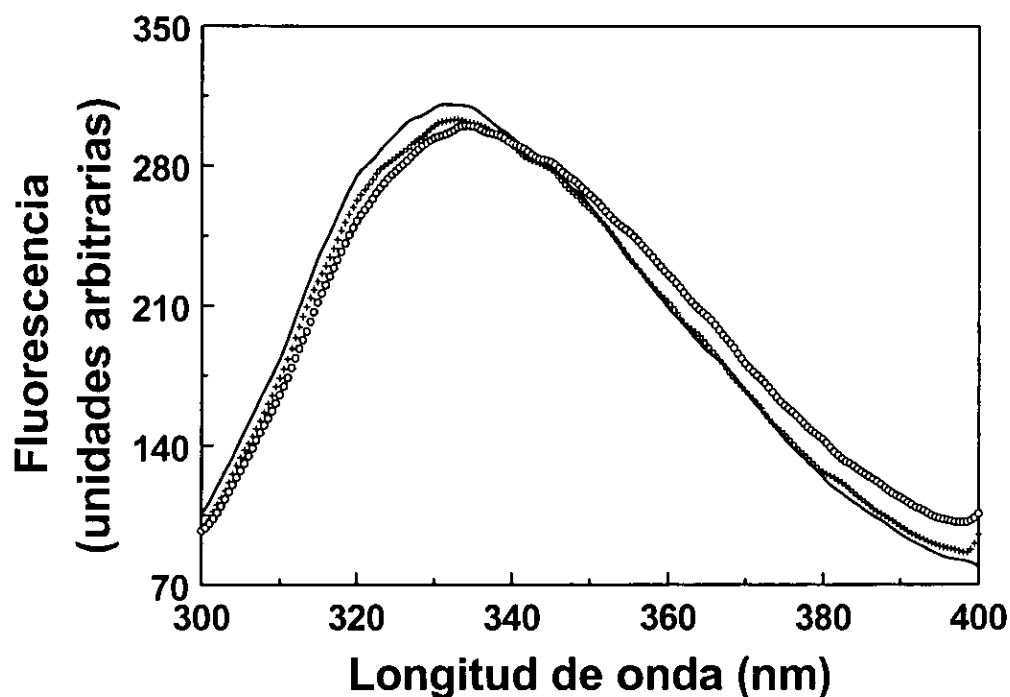


Figura 10. Espectros de emisión de fluorescencia de la BADH de *P. aeruginosa* inactivada a 40°C. Espectro de emisión de la enzima incubada a 30°C (línea continua) y expuesta a 40°C durante 10 (línea con cruces) y 30 minutos (línea con círculos). Después de 30 minutos a 40°C la enzima mostró un 65% de la actividad inicial. El medio contenía a la enzima (20 µg/ml) en amortiguador de fosfato de potasio 10 mM (pH 6.9) con EDTA 0.1 mM, sacarosa 20% (P/V) y KCl 25 mM. Para mayor detalle ver "Fluorescence measurements" en materiales y métodos del Artículo I.

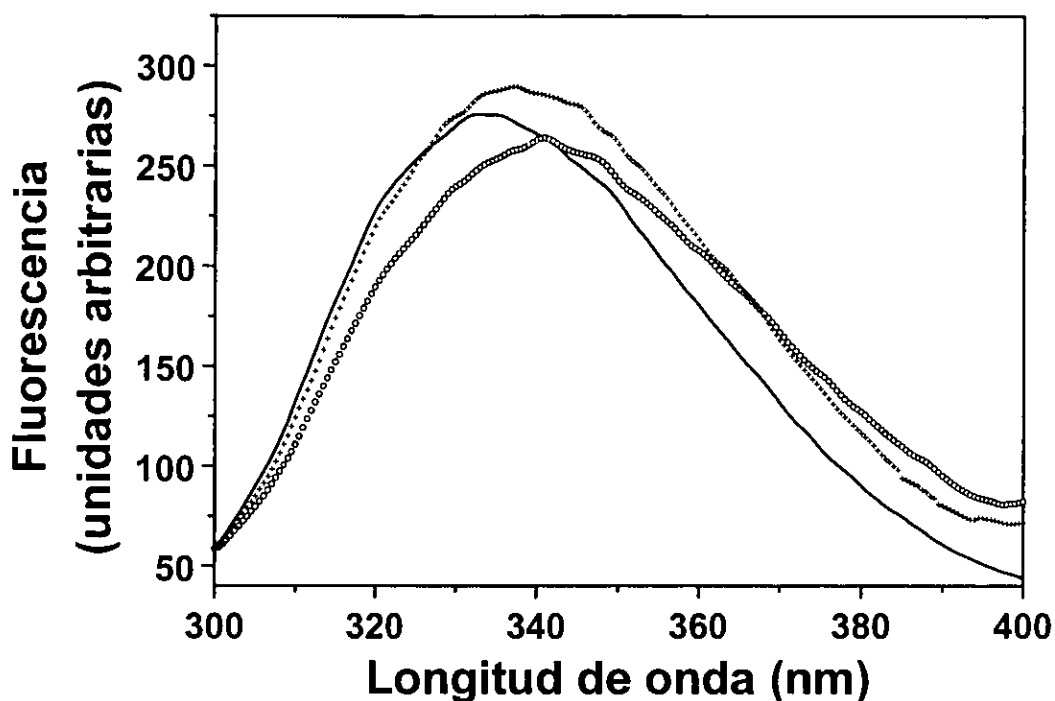


Figura 11. Espectros de emisión de fluorescencia de la BADH de *P. aeruginosa* inactivada en amortiguador Tris-HCl. Espectro de emisión de la enzima recién mezclada con el amortiguador (línea continua) y con 15 (línea con cruces) y 30 minutos (línea con círculos). Después de 30 minutos de incubación la enzima mostró un 3% de la actividad inicial. El medio contenía la enzima (20 $\mu\text{g/ml}$) en amortiguador Tris-HCl (pH 8.0). Junto con la enzima se "arrastró" al medio de incubación EDTA 7.5 μM , sacarosa 1.5% (p/v) y KCl 1.9 mM, además de 0.8 mM de fosfato de potasio del amortiguador de almacenamiento de la enzima. La temperatura de incubación fue 30°C. Para mayor detalle, ver "Fluorescence measurements" en materiales y métodos del Artículo I.

mM), añadidos por separado, brindaron una protección parcial frente a la inactivación, en tanto que, al usarlos simultáneamente, se estabilizó totalmente a la enzima (Figura 7C, Artículo I).

Los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para la enzima de *P. aeruginosa* inactivada en amortiguador Tris-HCl se presentan en la Figura 11. Como era de esperarse, por el grado, la velocidad y la aparente irreversibilidad de la inactivación provocada por este factor, los cambios en la emisión fueron más drásticos que con el calor, llegando a un máximo de emisión de 341 nm. Un aspecto que llama la atención aquí es el incremento en la emisión de la proteína a los 15 min de incubación con el Tris. Esto posiblemente sea una evidencia, como ya se ha reportado (Senkevich *et al.*, 1986), del contacto de los residuos de Trp con los de His, que se encuentran desprotonados en el pH utilizado.

El desplazamiento del pico de emisión máxima a 341 nm podría ser resultado de los cambios en la estructura secundaria y terciaria que llevan a un desplegamiento crítico de la proteína y con ello, tal vez, a una inactivación irreversible (formación de I').

Interesante también es el hecho de que a los 15 min de haber puesto la enzima en el amortiguador Tris-HCl, en ausencia de estabilizantes, la inactivación se haya dado casi por completo (Figura 7C, Artículo I), mientras que a este mismo tiempo todavía se siguen presentando cambios significativos en la conformación de la molécula (Figura 11), lo que apoya la sugerencia de que el sitio activo de las enzimas es altamente flexible (Tsou, 1998) y pierde su conformación activa más rápidamente que el resto de la estructura proteica.

VI.5. Propiedades cinéticas y relevancia metabólica de la BADH

Los parámetros cinéticos, las constantes de inhibición por productos e inhibidores sin salida (dead-end), obtenidos para las reacciones de la BADH dependientes de NAD^+ y NADP^+ , se muestran en los Cuadros 1, 2 y 3 del Artículo II (punto VI.2.). Estos fueron estimados de las Figuras 1 a 6 de dicho artículo y de las que se presentan en el APÉNDICE 1 de esta tesis.

Como ya se mencionó en el Artículo II las reacciones de la BADH de *P. aeruginosa*, dependientes de NAD^+ y NADP^+ , tienen un mecanismo cinético bi bi al azar y no ping-pong, como se ha encontrado para las BADHs de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990), *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1997) y *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980), o iso bi bi ordenado, reportado para las BADHs de *Amaranthus hypochondriacus* (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993) y de riñón de cerdo (Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000).

La enzima purificada es específica para la betaína aldehído. Con base en los valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{dinucleótido}}$ encontrados (Cuadro 3), también podemos decir que la enzima de *P. aeruginosa* prefiere el NADP^+ sobre el NAD^+ . Sus valores de $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{betaína aldehído}}$ en cambio, fueron similares para las reacciones dependientes de NAD^+ y NADP^+ (3.1×10^5 y $2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente). La mayor afinidad por el NADP^+ hace a la enzima de *P. aeruginosa* semejante a la de *X. translucens*, pero diferente con respecto a todas las demás BADHs que se conocen, las que prefieren NAD^+ (ver Cuadro 3). Cabe mencionar que *X. translucens* y *P. aeruginosa* pertenecen a la misma familia taxonómica (*Pseudomonadaceae*), y debido a que su similitud es tan alta a nivel del RNA ribosomal se ha propuesto incluir la especie *Pseudomonas maltophilia* dentro del género *Xanthomonas*, con el nombre de *Xanthomonas maltophilia* (Swings *et al.*, 1983); ésto bien podría explicar la similitud en la especificidad de sus BADHs por las coenzimas.

Un análisis comparativo de las $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{dinucleótido}}$ de BADHs de distintas bacterias (Cuadro 3, considérense las restricciones que se mencionan en el pie de figura) nos permite señalar que *X. translucens* posee una enzima que es altamente eficiente con ambas coenzimas, lo que representa una valiosa aportación de equivalentes reductores para sus cientos de enzimas involucradas con procesos anabólicos, catabólicos o de defensa celular. La BADH de *E. coli* en cambio es más eficiente con NAD^+ .

En el caso de *P. aeruginosa* la alta eficiencia y preferencia que presenta su BADH por el NADP^+ , aunado a el papel catabólico que posee esta enzima ya que la bacteria puede crecer en un medio en donde la única fuente de carbono, nitrógeno y

Cuadro 3. Propiedades cinéticas de las BADHs purificadas hasta ahora.

Propiedad	Fuente biológica										
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>X. translucens</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. didymum</i>	Hoja de <i>A. hypochondriacus</i>	Hoja de <i>S. oleracea</i>	Tejido cardiaco de <i>L. polyphemus</i>	Higado de humano	Higado de rata	
Especificidad absoluta por BA	Si	Si	Si	Si	Si	No	No	Si	No	No	
K_m betaina aldehído (μM)	NAD ⁺	435 (380)	125	190	160	310	69	nd	133	260	118
	NADP ⁺	507 (nd)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
K_m dinucleótido (μM)	NAD ⁺	385 (220)	143	70	99	380	80	20	22	35	34
	NADP ⁺	83 (89)	1000	50	400	No utiliza	2500	320	267	nd	nd
V_{max} (U/mg proteína)	NAD ⁺	152 (nd)	15.9	179	66	21	2.0	2.2	220	7.0	3.4
	NADP ⁺	143 (nd)	nd	133	30	nd	nd	1.6	nd	nd	nd
k_{cat} ^a (s ⁻¹)	NAD ⁺	^b 277 (nd)	29	597	255	75	nd	4.1	nd	nd	nd
	NADP ⁺	^b 261 (nd)	nd	443	116	nd	nd	3.0	nd	nd	nd
k_{cat}/K_m dinucleótido ^a (M ⁻¹ s ⁻¹)	NAD ⁺	3.6 X 10 ⁵	1 X 10 ⁵	2.1 X 10 ⁶	6.4 X 10 ⁵	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	NADP ⁺	1.6 X 10 ⁶	nd	2.2 X 10 ⁶	2.9 X 10 ⁵	nd	nd	nd	nd	nd	nd
k_{cat}/K_m betaina aldehído ^a (M ⁻¹ s ⁻¹)	NAD ⁺	3.1 X 10 ⁵	1.2 X 10 ⁵	7.9 X 10 ⁵	4.9 X 10 ⁵	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	NADP ⁺	2.6 X 10 ⁵	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
pH en el ensayo	8.0	8.0	7.0	7.5	8.0	8.0	8.0	8.0	7.5	7.4	7.4
Temperatura en el ensayo (°C)	30	30	30	25	30	30	22	25	25	25	25

^aEstos valores se calcularon en el presente trabajo a partir de la V_{max} y la K_m que se menciona para cada enzima. Lo anterior se hizo con fines comparativos suponiendo que las proteínas fueron purificadas a homogeneidad y que no han sufrido inactivación alguna. No obstante, estos datos se deben considerar con cautela. ^bEstos valores se estimaron considerando a la enzima de *P. aeruginosa* como un homodímero de 109 Kda con dos sitios activos (Artículo I). Los datos se tomaron de las siguientes fuentes: *P. aeruginosa* (Artículo II y entre paréntesis los publicados por Nagasawa *et al.*, 1976); *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1997); *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992); *E. coli* (Falkenberg and Strom 1990); *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980); hoja de *A. hypochondriacus* (Valenzuela-Soto and Muñoz-Clares, 1993); hoja de *S. oleracea* (Weretilnyk and Hanson, 1989); tejido cardiaco de cangrejo (Dragolovich and Pierce, 1999); hígado de humano (Kurys *et al.*, 1989 and 1993; Chern and Pietruszko, 1995); hígado de rata (Chern and Pietruszko, 1999); nd, no determinado.

energía es la colina (Nagasawa *et al.*, 1976), parecen conferir a esta BADH una función importante en el metabolismo de *P. aeruginosa*. Para entender mejor esta importancia tenemos que considerar también que a diferencia de otras bacterias, como *E. coli*, *P. aeruginosa* no metaboliza la glucosa por la vía de la glucólisis, debido a que no posee la enzima 6-fosfofructocinasa (Lessie y Phibbs, 1984). Esta bacteria realiza el catabolismo de glucosa, hasta piruvato y gliceraldehído-3-fosfato, a través de la vía de Entner-Doudoroff (Figura 12) (Lessie y Neidhardt, 1967). En dicha ruta, la glucosa es incorporada por un transportador membranaral inducible y luego es fosforilada por la glucocinasa y convertida a 6-fosfogluconato por la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Esta última enzima (Ma *et al.*, 1998), al igual que la BADH de *P. aeruginosa* y las G6PDHs de *Leuconostoc mesenteroides* (Levy *et al.*, 1996) y de *Azotobacter vinelandii* (Anderson y Anderson, 1995), que catalizan el primer paso de la vía de las pentosas fosfato, utilizan ambas coenzimas. De manera interesante, las cuatro enzimas antes mencionadas tienen una marcada preferencia por el NADP⁺ (de 2 a 9 veces, definida por los valores de $k_{cat}/K_m^{\text{dinucleótido}}$, ver Cuadro 4).

Las cuatro enzimas que se mencionan en el Cuadro 4 también presentan una mayor V_{max} (o k_{cat}) con el NAD⁺ que con el NADP⁺ y la K_m por el segundo sustrato (BA o Gluc-6-P) se encuentra en el mismo orden de magnitud para casi todas ellas. Esta alta similitud de la BADH con las G6PDHs, y sobre todo con la de la misma *P. aeruginosa*, sugiere que la BADH podría estar reemplazando a la G6PDH en su papel como productor de equivalentes reductores bajo condiciones de cultivo en donde la colina es la única fuente de carbono y nitrógeno. En un medio con glucosa y colina, la BADH podría participar conjuntamente con la G6PDH en las actividades mencionadas, pues como ya se dijo, en el presente trabajo una concentración de glucosa 11 mM en un medio con colina 20 mM provocó una disminución del 66% en la actividad de BADH, sin que se afectara el crecimiento del cultivo. Esto habla de una sustitución parcial de la actividad de BADH por la de G6PDH. La BADH podría además tener un papel adaptativo, bajo condiciones de estrés osmótico, sintetizando GB como osmoprotector (ver Figura 12). Para esto, seguramente también es necesario que la degradación de GB disminuya, como se ha propuesto para *R. melilotii* (Smith *et al.*, 1988).

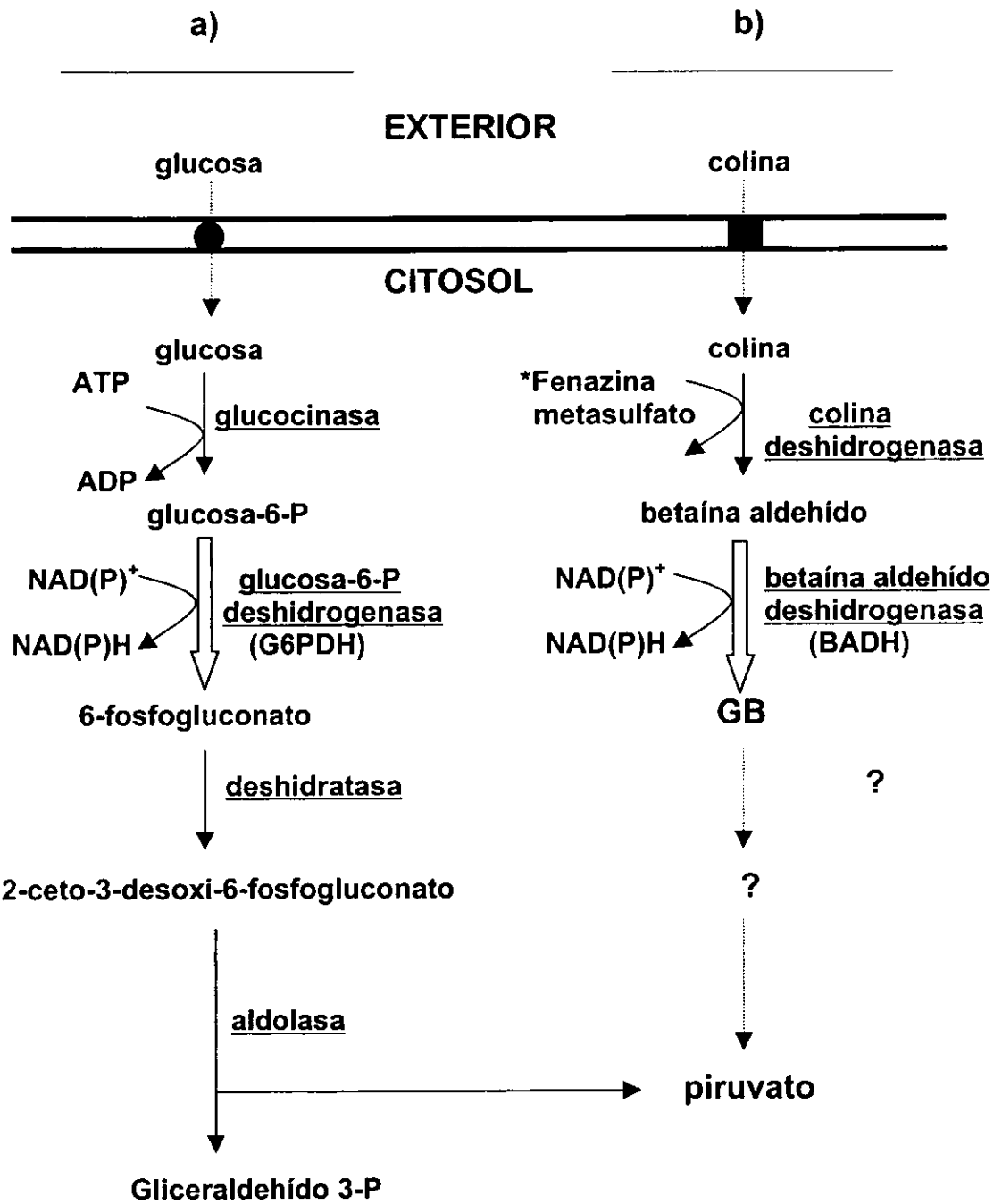


Figura 12. Propuesta de cómo se relacionan las vías donde participan la G6PDH y la BADH de *P. aeruginosa*. a), vía de Entner-Doudoroff (Hunt y Phibbs, 1983); b), ruta catabólica de la GB. Se sugiere que en *P. aeruginosa* la degradación de GB desemboca en la síntesis de piruvato como se ha propuesto para *R. meliloti* (Smith *et al.*, 1988), sin embargo, hasta la fecha no tenemos conocimiento de los intermediarios de esta vía en *P. aeruginosa*. *La fenazina metasulfato es el único compuesto que sirve como aceptor de electrones artificial para la colina deshidrogenasa de *P. aeruginosa* (Russell y Scopes, 1994).

Cuadro 4. Comparación de algunas constantes cinéticas de la BADH de *P. aeruginosa* con las de las G6PDHs de tres diferentes microorganismos (incluyendo a *P. aeruginosa*).

Parámetro Cinético	Enzima				
		BADH	G6PDH		
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>A. vinelandii</i>
K_m dinucleótido (μM)	NAD ⁺	385	333	162	220
	NADP ⁺	83	57	8	50
K_m betaína aldehído (μM)	NAD ⁺	435	nd	nd	nd
	NADP ⁺	507	nd	nd	nd
K_m glucosa-6-P (μM)	NAD ⁺	nd	nd	69	690
	NADP ⁺	nd	530	114	530
V_{max} (u/mg proteína)	NAD ⁺	152	176	nd	nd
	NADP ⁺	140	69	nd	nd
k_{cat} ^a (s ⁻¹)	NAD ⁺	277	645	1125	85
	NADP ⁺	261	253	522	37
k_{cat}/K_m dinucleótido (M ⁻¹ s ⁻¹)	NAD ⁺	3.6×10^5	4.8×10^5	3.5×10^6	9.7×10^4
	NADP ⁺	1.6×10^6	1.1×10^6	3.3×10^7	1.9×10^5
$k_{\text{cat}}/K_m^{\text{BA o G-6-P}}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)	NAD ⁺	3.1×10^5		8.2×10^6	3.1×10^4
	NADP ⁺	2.6×10^5	1.2×10^5	2.3×10^6	1.7×10^4

^aEstos valores se calcularon en el presente trabajo a partir de la K_m y V_{max} que se menciona para cada enzima. Lo anterior se hizo con fines comparativos y suponiendo que las proteínas fueron purificadas a homogeneidad, como reportan los autores, y que no han sufrido inactivación alguna. No obstante, estos datos se deben considerar con cautela. Los datos se tomaron de las siguientes fuentes: BADH de *P. aeruginosa* (Artículo II); G6PDH de *P. aeruginosa* (Ma *et al.*, 1998); G6PDH de *L. mesenteroides* (Levy *et al.*, 1996); G6PDH de *A. vinelandii* (Anderson y Anderson, 1995). **nd**, No determinado.

La enzima G6PDH de *P. aeruginosa* también parece estar involucrada en los mecanismos de defensa de la bacteria ante agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido. La resistencia a estos intermediarios de oxígeno reactivos involucra a las enzimas superóxido dismutasas (Hassett *et al.*, 1992, 1993 y 1995) y al menos dos hemocatalasas (Brown *et al.*, 1995). Se ha propuesto que bajo un estrés oxidativo producido por la presencia de paraquat (metil viológeno), se requiere de un incremento de la actividad de la G6PDH, debido a que hay una mayor demanda de NADPH por parte de las enzimas glutatión y alquilhidroxiperóxido reductasas (Asnis, 1955; Jacobson *et al.*, 1989), enzimas que son importantes para el combate del estrés oxidativo generado por el paraquat. Resulta muy interesante que las mutantes deficientes en G6PDH de *P. aeruginosa* (Ma *et al.*, 1998) y de *E. coli* (Greenberg *et al.*, 1990) sean más sensibles al superóxido generado por el paraquat, lo que sugiere que esta sensibilidad se debe a niveles bajos de NADPH. Podemos suponer que la BADH podría sustituir también a la G6PDH para el combate del estrés oxidativo.

Es difícil decir bajo qué condiciones la BADH de *P. aeruginosa* tendría preferencia por alguna de las coenzimas (NAD^+ o NADP^+). De hecho en el presente trabajo se intentó conocer si la enzima presentaba cambios de este tipo midiendo simultáneamente las reacciones dependientes de NAD^+ y NADP^+ . El método se basa en que los análogos de tionicotinamida de NADH y NADPH presentan un máximo de absorción de la luz a 400 nm, por lo que se puede medir la aparición de cualquiera de estos compuestos al mismo tiempo que la de las coenzimas naturales reducidas (Levy y Daouk, 1979). Desafortunadamente no se logró este objetivo debido a la complejidad que presenta la cinética con S-NAD(P) $^+$. Podemos suponer que la utilización de las coenzimas debe estar regulada *in vivo*. Un factor importante en dicho control podría ser la proporción de $[\text{NAD}^+]/[\text{NADP}^+]$ presente en las células. Existen reportes acerca de los niveles de estas coenzimas en el género *Pseudomonas* (Kaplan *et al.*, 1960; Takebe y Kitahara, 1963; London y Kanight, 1966; Wimpenny y Firth, 1972), pero los valores reportados están dados en nmoles/mg de peso seco y varían desde 190 hasta 2400 para el NAD^+ , y de 40 a 300 en el caso del NADP^+ . En estos estudios, como los realizados en *E. coli* (Lundquist y Olivera, 1971 y 1973), la proporción de $[\text{NAD}^+]/[\text{NADP}^+]$ es en promedio de 5, por lo que se podría pensar que *in vivo* se abate la preferencia que hemos dicho posee la BADH por NADP^+ . En el caso de *E. coli* esta

proporción se mantiene constante en todas las fases del crecimiento poblacional (Lundquist y Olivera, 1971), pero bajo condiciones de ayuno (ausencia de niacina en el medio) el valor $[NAD^+]/[NADP^+]$ disminuye de 3.2 a 0.4 (Lundquist y Olivera, 1973). Hasta donde tenemos conocimiento, en *P. aeruginosa* no se tienen reportes de este tipo de variaciones después de un cambio en la fuente de carbono (por ejemplo de glucosa a colina), o al someter al microorganismo a condiciones de estrés (osmótico u oxidativo).

En el caso de la enzima G6PDH de *L. mesenteroides*, un incremento en la concentración del sustrato glucosa-6-fosfato lleva a una mayor utilización del NAD^+ sobre el $NADP^+$ (Levy y Daouk, 1979; Levy *et al.*, 1979). Para la enzima BADH de *P. aeruginosa* no es tan evidente que los niveles de betaína aldehído puedan regular esta preferencia en la especificidad por la coenzima (ver $k_{cat}/K_m^{betaína\ aldehído}$ en el Cuadro 4). No obstante, considerando las similitudes que existen entre los parámetros cinéticos de esta enzima y los de la G6PDH de diferentes organismos (Cuadro 4), en su utilización dual de coenzimas y en la posición que ocupan en el metabolismo (ver Figura 12), además de las semejanzas en los patrones de inhibición obtenidos con inhibidores sin salida para la BADH en este trabajo y en el desarrollado con G6PDH de *L. mesenteroides* (Levy *et al.*, 1983), podemos suponer que en *P. aeruginosa* ambas enzimas están sujetas al mismo tipo de control metabólico que permite a la célula abastecer, según sus necesidades, de NADH y NADPH. Es necesario, sin embargo, determinar la participación que en este sentido tienen las dos enzimas *in vivo*, sobre todo si consideramos que varios de los sitios que infecta *P. aeruginosa* presentan altas concentraciones de los precursores de colina.

VI.6. Clonación del gen de BADH y sobreexpresión de la enzima

Debido a que pretendemos en un futuro, con ayuda de la mutagénesis dirigida, conocer los aminoácidos que son esenciales para la actividad de la BADH de *P. aeruginosa*, en el presente trabajo se planteó clonar el gen de esta enzima y sobreexpresarla en *E. coli*. En la Figura 13A se muestra el producto obtenido por PCR utilizando la enzima Taq DNA polimerasa. Este fragmento de DNA tenía el tamaño esperado para el gen de BADH (1475 pb). Después de cortar éste y el vector pCAL-n

con las enzimas NdeI y EcoRI y habiéndolos ligado entre sí, se transformó con este producto la cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS. La Figura 13B muestra el DNA plasmídico de una de estas clonas transformadas, cuyo tamaño corresponde al esperado después de ligar el vector con el inserto (7200 pb). Una de las clonas transformadas fue seleccionada al azar para inducir en ella la síntesis de BADH con IPTG 1 mM en medio LB con carbenicilina (50µg/mL). Las Figuras 14A y B presentan el patrón proteico y las inmunorrélicas, respectivamente, de la clona incubada durante 0, 1½, 3 y 5 horas en presencia del IPTG. En ellas podemos observar que desde las 1 ½ horas de incubación se presenta prácticamente la máxima expresión de una proteína con una masa molecular igual a la de la BADH de *P. aeruginosa*. Las células crecidas durante 5 horas en presencia de IPTG fueron utilizadas para determinar la actividad de BADH, según se describe en la sección de Material y Métodos. Los resultados obtenidos de este análisis mostraron que el extracto celular de la clona de *E. coli* transformada tenía en promedio 36 U de BADH/mg de proteína, que equivalen a una sobreexpresión de 36 veces la actividad determinada en *P. aeruginosa* creciendo en M63 con colina (Artículo I).

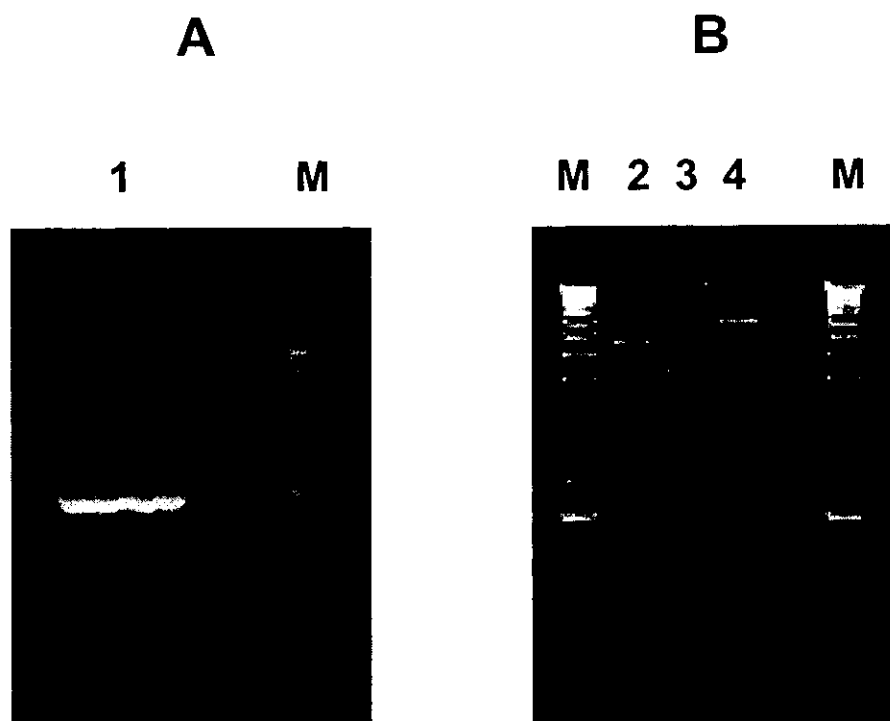


Figura 13. Amplificación del gen de la BADH por PCR (A) y su inserción en el vector pCALn (B). El DNA fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 1% y revelado con bromuro de etidio. 1, producto de PCR utilizando Taq DNA polimerasa; 2, vector pCALn digerido con NdeI y EcoRI; 3, DNA plasmídico de una clona transformada; 4, DNA plasmídico del carril, pero digerido con EcoRI. M, marcadores de tamaño.

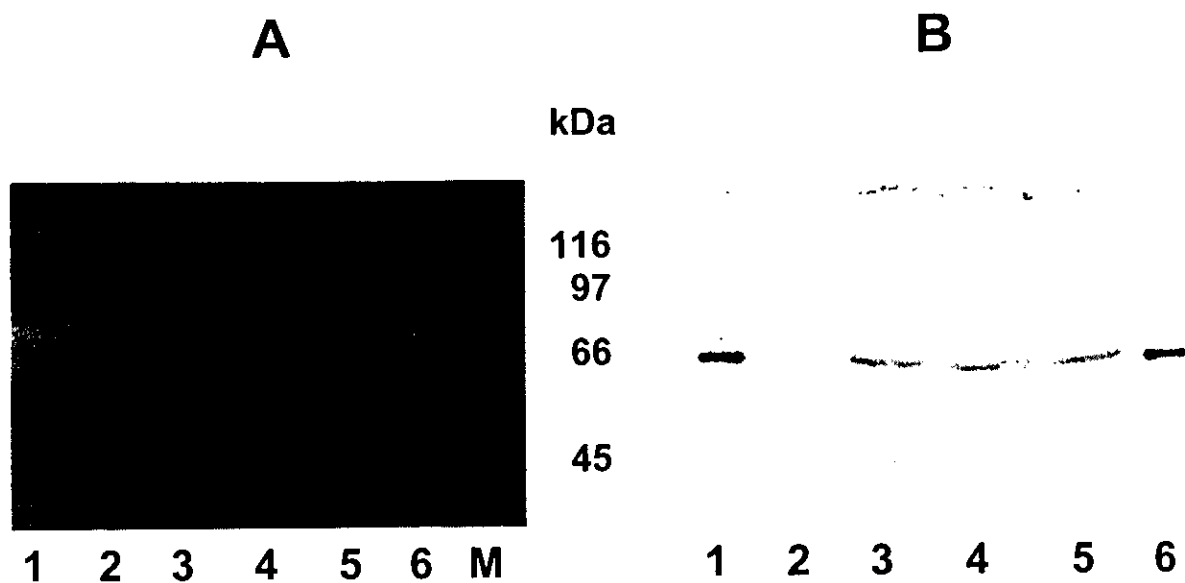


Figura 14. Inducción de la síntesis de la BADH de *P. aeruginosa* en *E. coli* BL21(DE3)pLysS. (A) Patrón proteico en geles de poliacrilamida al 8% con SDS. Los carriles 1 y 6 presentan la BADH (1 μ g) purificada de *P. aeruginosa*. Del carril 2 al 5 se muestran las proteínas de *E. coli* BL21(DE3)pLysS incubada con IPTG 1 mM durante 0, 1 $\frac{1}{2}$, 3 y 5 horas, respectivamente. M, marcadores de masa molecular. (B) Inmunorrelicas del gel mostrado en (A). Como primer anticuerpo se utilizó uno policlonal obtenido contra la BADH de *P. aeruginosa* (para mayor detalle ver punto V.1.5 en Material y Métodos).

VII. CONCLUSIONES

El presente trabajo es el inicio de una investigación que pretende conocer la estructura y función de la BADH de *P. aeruginosa*. Aquí se han evidenciado diversas características fisicoquímicas de la enzima, entre las que destacan el requerimiento que tiene por K^+ y $NADP^+$ para su estabilidad y la protección que esta coenzima le confiere ante diversas condiciones de inactivación. La dependencia de potasio para la estabilidad de la enzima, no reportada hasta ahora para otras BADHs, permiten considerar a la enzima de *P. aeruginosa* como un blanco para la inhibición por otros cationes monovalentes no esenciales, lo que podría llevar a una acumulación del sustrato betaína aldehído que es tóxico para la bacteria.

En relación a sus características cinéticas, se ha demostrado que la BADH de *P. aeruginosa* es una enzima muy eficiente, específica por la betaína aldehído y aún cuando utiliza NAD^+ y $NADP^+$ prefiere a esta última coenzima. Cabe señalar que otra BADH que tiene esta inusual preferencia por el $NADP^+$ pertenece a *X. translucens*, una bacteria que como *P. aeruginosa* puede crecer en un medio donde la única fuente de carbono y nitrógeno es la colina. Esta utilización dual de coenzimas que presentan ambas enzimas, junto con la participación que tienen en vías que abastecen al organismo de nutrientes, sugieren que en estos organismos la BADH podría jugar un papel anabólico o catabólico, dependiendo de si utiliza $NADP^+$ o NAD^+ .

Las reacciones de la BADH dependientes del NAD^+ y $NADP^+$ presentan mecanismos cinéticos bi bi al azar en estado estacionario, con una preferencia, particularmente en la reacción dependiente de $NADP^+$, por la ruta en donde el $NAD(P)^+$ enlaza primero a la enzima y el $NAD(P)H$ es el último en abandonarla. Este mecanismo difiere completamente de los reportados hasta ahora para otras BADHs. Sin embargo, llama la atención las semejanzas cinéticas (alta eficiencia, utilización dual de coenzimas con preferencia por el $NADP^+$, parecida afinidad por el segundo sustrato y la similitud en la posición que ocupan en sus respectivas vías metabólicas), que existen entre la BADH de *P. aeruginosa* y la G6PDH de diversos organismos, incluyendo la de *P. aeruginosa*. Aún más, a pesar de que hasta ahora no se conoce el mecanismo cinético de la G6PDH de esta bacteria, se ha reportado que el de la misma enzima anfibólica, pero de *L. mesenteroides*, es similar al de la BADH de *P. aeruginosa*: ordenado para la

reacción dependiente de NADP⁺ y al azar en la dependiente de NAD⁺ (Levy *et al.*, 1983). Todas estas similitudes permiten proponer que la BADH de *P. aeruginosa* no se involucra únicamente en la síntesis del osmoprotector GB. Cuando la bacteria crece en colina o en alguno de los precursores de esta molécula, la BADH podría reemplazar a la enzima G6PDH, que actúa en la ruta de Entner-Doudoroff cuando hay glucosa en el medio, en su papel abastecedor de coenzimas reducidas. La preferencia de esta BADH por sus coenzimas podría estar regulada *in vivo* según las necesidades metabólicas de la célula.

Otras metas alcanzadas en la presente investigación han sido el desarrollo de un método rápido y eficiente para purificar la BADH de *P. aeruginosa*, la obtención de un anticuerpo específico contra ella, así como la clonación de su gen y su sobreexpresión en *E. coli*. Dichos logros nos permitirán en un futuro profundizar más en el conocimiento de la estructura y función de la BADH de *P. aeruginosa*.

VIII. PERSPECTIVAS

1. Utilizando la técnica de mutagénesis sitio dirigida se pretende obtener diversas mutantes de la BADH en donde se reemplacen individualmente algunos de los aminoácidos esenciales para la catálisis y/o la unión de los sustratos.
2. Considerando el papel que tiene el K^+ como estabilizador de la enzima, manipular algunos de los residuos que putativamente pudieran formar parte del sitio de unión para este catión.
3. Caracterizar, cinética y fisicoquímicamente, a estas enzimas mutantes para determinar y/o confirmar el papel que los aminoácidos investigados juegan en la cinética (paso limitante de la reacción, mecanismo cinético, especificidad para el sustrato y coenzima) o en el mantenimiento de la estructura nativa de la enzima.
4. Intentar obtener cristales de la enzima para conocer su estructura tridimensional por cristalografía de rayos X. Esto nos permitirá conocer la posición real de los diferentes residuos, las interacciones que se dan entre ellos y el potasio o los sustratos, así como los aminoácidos que participan en la estabilidad de la estructura proteica y en la interfase subunidad-subunidad. De esta forma podremos también saber si la enzima y las coenzimas forman los complejos no productivos que se han propuesto: $E.NAD(P)^+_2$, $E.NAD(P)H_2$ y $E.NADP^+.NADPH$.
5. Buscar inhibidores para la BADH de *P. aeruginosa* con la intención de poder utilizarlos en un futuro como agentes terapéuticos contra esta bacteria. Considerando la estabilidad que le confiere el potasio a esta enzima, la búsqueda podría iniciarse probando el efecto de diversos cationes monovalentes sobre la actividad de esta BADH. Además, considerando la relativa alta identidad que esta enzima tiene con la aldehído deshidrogenasa de hígado (Figura 9), se deberá probar el efecto que sobre ella tienen dos inhibidores de la última (Hart y Faiman, 1994; Mukerjee y Pietruszko, 1994): el disulfiram o sus derivados, que se usan en el tratamiento del alcoholismo, y el ISDN, utilizado en el tratamiento de la angina de pecho.

6. Con relación a la participación de la BADH como productora de equivalentes reductores y como posible sustituyente de la G6PDH en esta función, cuando la bacteria se crece en un medio con colina o con sus precursores en lugar de glucosa, se deberán determinar los niveles y actividades de estas dos enzimas teniendo en el medio de cultivo alguna(s) de las siguientes condiciones: glucosa, colina, glucosa y colina, colina en presencia de un estrés osmótico (causado por altas concentraciones de NaCl) o de un estrés oxidativo (causado por metil viológeno).

IX. REFERENCIAS

- Ambrosiak, W. y Pietruszko, R. 1991. Human aldehyde dehydrogenase: activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* **266**, 13011-13018.
- Anderson, B. M. y Anderson, C. D. 1995. Purification and characterization of *Azotobacter vinelandii* glucose-6-phosphate dehydrogenase: dual coenzyme specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* **321**, 94-100.
- Andresen, P. A., Kaasen, I., Styrvold, O. B., Bulnois, G. y Stroem, A. R. 1988. Molecular cloning, physical mapping and expression of the *bet* genes governing the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1737-1746.
- Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T. y Akazawa, T. 1987. Purification of betaine-aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* **101**, 1485-1488.
- Arakawa, K., Katayama, M. y Takabe, T. 1990. Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol.* **31**, 797-803.
- Arakawa, K., Mizuno, K., Kishitani, S. y Takabe, T. 1992. Immunological studies of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol.* **33**, 833-840.
- Asnis, R. E. 1955. A glutathione reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **213**, 77-85.
- Bernard, T., Perroud, B., Pocard, J. A. y Le Rudulier, D. 1986. Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch. Microbiol.* **143**, 359-364.
- Boch, J., Kempf, B. y Bremer, E. 1996. Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *J. Bacteriol.* **178**, 5121-5129.
- Boch, J., Nau-Wagner, G., Kneip, S. y Bremer, E. 1997. Glycine betaine aldehyde dehydrogenase from *Bacillus subtilis*: characterization of an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *Arch. Microbiol.* **168**, 282-289.

Boyd, L. A., Adam, L., Pelcher, L. E., Mchughen, A., Hirji, R. y Selvaraj, G. 1991. Characterization of an *Escherichia coli* gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase (BADH): structural similarity to mammalian ALDH's and a plant BADH. *Gene* **103**, 45-52.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-256.

Bradley, S. 1997. Bacteriology 330 Lecture Topics: *Pseudomonas aeruginosa*. Retrieved. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Retrieved June 14, 1999 from World Wide Web: www.bact.wisc.edu/bact330/StudentPseudomonaswww

Brown, A. D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* **40**, 803-846.

Brown, S. M., Howell, M. L., Vasil, M. L., Anderson, A. y Hassett D. J. 1995. Cloning and characterization of the *katB* gene of *Pseudomonas aeruginosa* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase: purification of KatB, cellular localization, and demonstration that it is essential for optimal resistance to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* **177**, 6536-6544.

Cleland, W. W. 1963. The kinetics of enzyme-catalysed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. *Biochim. Biophys. Acta* **467**, 104-137.

Collier, D. N., Hager, P. W. y Phibbs, P. V. Jr. 1996. Catabolite repression control in the Pseudomonads. *Res. Microbiol.* **147**, 551-561.

Csonka, L. N. y Epstein, W. 1996. Osmoregulation. In: Neidhard F. C. *et al.* (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. ASM Press, Washington DC, pp 1210-1223.

Chambers, T. S. y Kunin, M. C. 1987. Isolation of glycine betaine and proline betaine from human urine. Assesment of their role as osmoprotective agents for bacteria and the kidney. *J. Clin. Invest.* **79**, 731-737.

Chern, M. K. y Pietruszko, R. 1995. Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**, 561-568.

Chern, M. K. y Pietruszko, R. 1999. Evidence for mitochondrial localization of betaine aldehyde dehydrogenase in rat liver: purification, characterization, and comparison with human cytoplasmic E3 isozyme. *Biochem. Cell. Biol.* **77**, 179-187.

Deitrich, R. A. 1966. Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde-oxidizing capacity. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1911-1922.

D'souza-Ault, M. R., Smith, L. T. y Smith, G. M. 1993. Roles of N-acetylglutaminyl-glutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 473-478.

Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. y Bakker E. P. 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Arch. Microbiol.* **158**, 348-357.

Domenech, E. C., Garrido, N. M. y Lisa, A. T. 1991. *Pseudomonas aeruginosa* cholinesterase and phosphorylcholine phosphatase: two enzymes contributing to corneal infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **82**, 131-136.

Dragolovich, J. y Pierce S. K. 1994. Characterization of partially purified betaine aldehyde dehydrogenase from horseshoe crab (*Limulus polyphemus*) cardiac mitochondria. *J. Exp. Zool.* **270**, 417-425.

Epstein, W. 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 73-78.

Eshoo, M. W. 1988. *lac* fusion analysis of the *bet* genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. *J. Bacteriol.* **170**, 5208-5215.

- Falkenberg, P. y Stroem, A. R.** 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**, 253-259.
- Farrés, J., Wang, T. T. Y., Cunningham, S. J. y Weiner, H.** 1995. Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 2592-2598.
- Feldman, R. I. y Weiner, H.** 1972. Horse liver aldehyde dehydrogenase. I. Purification and characterization. *J Biol. Chem.* **247**, 260-266.
- Figuroa-Soto C. G. y Valenzuela-Soto, E. M.** 2000. Kinetic study of porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**, 596-603.
- Forster, T.** 1948. Intermolecular energy transference and fluorescence. *Ann. Phys. (Leipzig)* **2**, 55-75.
- Galinski, E. A.** 1993. Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia.* **49**, 487-495.
- Galinski, E. A. y Trueper, H. G.** 1994. Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 95-108.
- Giaever, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I. y Stroem, A. R.** 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**, 2841-2849.
- Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D. y Demple B.** 1990. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6181-6185.
- Guzmán-Partida, A. M. y Valenzuela-Soto E. M.** 1998. Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **119**, 485-491.

Hanson, A. D., May, A. M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G. C. y Rhodes, D. 1985. Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**, 3678-3682.

Hart, B. H. y Faiman, M. D. 1994. *In vivo* pharmacodynamic studies of the disulfiram metabolite S-methyl N,N-diethylthiocarbamate sulfoxide: inhibition of liver aldehyde dehydrogenase. Alcohol. Clin. Exp. Res. **18**, 340-345.

Hassett, D. J., Charniga, L., Bean, K., Ohman, D. E. y Cohen M. S. 1992. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. Infect. Immun. **60**, 328-336.

Hasset, D. J., Woodruff, W. A., Wozniak, D. J., Vasil, M. L., Cohen, M. S. y Ohman, D. E. 1993. Cloning of the *sodB* genes encoding manganese and iron superoxide dismutase in *Pseudomonas aeruginosa*: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. J. Bacteriol. **175**, 7658-7665.

Hasset, D. J., Schweizer, H. P. y Ohman, D. E. 1995. *Pseudomonas aeruginosa sodA* and *sodB* mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. J. Bacteriol. **177**, 6330-6337.

Hempel, J., von Bahr-Lindstrom, H. y Jornvall, H. 1984. Aldehyde dehydrogenase from human liver: Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. Eur. J. Biochem. **141**, 21-35.

Hempel, J., Nicholas, H. y Ronald L. 1993. Aldehyde dehydrogenases: Widespread structural and functional diversity within a shared framework. Protein Science **2**, 1890-1900.

Higgins, C. F., Cairney, J., Stirling, D. A., Sutherland, L. y Boot I. R. 1987. Osmotic regulation of gene expression: ionic strength as an intracellular signal? Trends Biochem. Sci. **12**, 339-344.

Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S. Y. and Takabe, T. 1995. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid. Plant Mol. Biol. **27**, 307-315.

Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F. y Ames, B. N. 1989. An alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium* involved in the defense of DNA against oxidative damage: purification and properties. *J. Biol. Chem.* **264**, 1488-1496.

Jakoby, W. J. 1963. Aldehyde dehydrogenases. En: Boyer, P. D. (ed.). *The Enzymes*, Vol. 7, 2nd ed., Academic Press, New York. pp.203-221.

Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. y Eklund H. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science* **7**, 2106-2117.

Kaplan, N. O. 1960. The pyridine coenzymes. In: Boyer, P. D., Lardy H. and Myrback, K. (eds.). *The Enzymes*, Vol 3. Academic Press Inc., New York. p. 105.

Kedishvilli, N. Y., Popov, K. M., Rougraff, P. M., Zhao, Y., Crabb, D. W. y Harris, R. A. 1992. CoA-dependent methylmalonate semialdehyde dehydrogenase, a unique member of the aldehyde dehydrogenase superfamily. *J. Biol. Chem.* **267**, 19724-19729.

Kempf, B. y Bremer, E. 1998. Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. *Arch. Microbiol.* **170**, 319-330.

Kikonyogo, A. y Pietruszco, A. 1996. Aldehyde dehydrogenase from adult human brain that dehydrogenates γ -aminobutyraldehyde: purification, characterization, cloning and distribution. *Biochem. J.* **316**, 317-324.

Krzywicki, K. A. y Brandriss, M. C. 1984. Primary structure of the nuclear PUT2 gene involved in the mitochondrial pathway for proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2837-2842.

Kurys, G., Ambroziak, W. y Pietruszco, R. 1989. Human aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **264**, 4715-4721.

- Kurys, G., Shah, P. C., Kikonyogo, A., Reed, D., Ambroziak, W. y Pietruszco, R. 1993. Human aldehyde dehydrogenase. cDNA cloning and primary structure of the enzyme that catalyzes dehydrogenation of 4-aminobutyraldehyde. *Eur. J. Biochem.* **218**, 311-320.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laimins, L. A., Rhoads, D. B. y Epstein, W. 1981. Osmotic repression of the *kdp* operon expression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 464-468.
- Lamark, T., Kaasen, E. M., Eshoo, W., Falkenberg, P., McDougall, J. y Stroem, A. R. 1991. DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 1049-1064.
- Lamark, T., Styrvoid, O. B. y Stroem, A. R. 1992. Efflux of choline and glycine betaine from osmoregulating cells of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**, 149-154.
- Lamark, T., Rokenes, T. P., Mcdougall, J. y Stroem, A. R. 1996. The complex *bet* promoters of *Escherichia coli*: regulation by oxygen (ArcA), choline (BetI), and osmotic stress. *J. Bacteriol.* **178**, 1655-1662.
- Landfald, B. y Stroem, A. R. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**, 849-855.
- Larsen, P. I., Sydnes, L. K., Landfald, B. y Stroem, A. R. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch. Microbiol.* **47**, 1-7.
- Laughlin, L. T. y Reed, G. H. 1997. The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**, 262-267.

- Legaría, J., Rajsbaum, R., Muñoz-Clares, R. A., Villegas-Sepúlveda, N., Simpson, J. y Iturriaga, G.** 1998. Molecular characterization of two genes encoding betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth. Expression in leaves under short-term exposure to osmotic stress or abscisic acid. *Gene* **218**, 69-76.
- Lessie, T. y Neidhardt, F. C.** 1967. Adenosine triphosphate-linked control of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Bacteriol.* **93**, 1337-1345.
- Lessie, T. G. y Phibbs, P. V. Jr.** 1984. Alternative pathway of carbohydrate utilization in Pseudomonads. *Annu. Rev. Microbiol.* **38**, 359-387.
- Levy, H. R., Daouk, G. H. y Katopes, M. A.** 1979. Regulation of coenzyme utilization by the dual nucleotide-specific glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Arch. Biochem. Biophys.* **198**, 406-413.
- Levy, H. R., y Daouk, G. H.** 1979. Simultaneous analysis of NAD- and NADP-linked activities of dual nucleotide-specific dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **254**, 4843-4847.
- Levy, H. R., Christoff, M., Ingulli, J. y Ho, E. M. L.** 1983. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*: revised kinetic mechanism and kinetics of ATP inhibition. *Arch. Biochem. Biophys.* **222**, 473-488.
- Levy, H. R., Vought, V. E., Yin, X. y Margaret, J. A.** 1996. Identification of an arginine residue in the dual coenzyme-specific glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* that plays a key role in binding NADP⁺ but not NAD⁺. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 145-151.
- Lindahl, R. y Hempel, J.** 1991. Aldehyde dehydrogenase: What can be learned from a baker's dozen sequences? *Adv. Exp. Med. Biol.* **284**, 1-8.
- Lindahl, R.** 1992. Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **27**, 283-335.

- Lippert, K. y Galinski, E. A. 1992. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 61-65.
- Lisa, T. A., Casale, C. H. y Domenech, C. E. 1994. Cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high-phosphate medium. *Curr. Microbiol.* **28**, 71-76.
- Liu, Z. L., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, Ch. D., Chang, W. R., Ingrid, K., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. y Wang, B. Ch. 1997. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 317-326.
- London, J. y Knight, M. 1966. Concentrations of nicotinamide nucleotide coenzymes in micro-organisms. *J. Gen. Microbiol.* **44**, 241-254.
- Lucchesi, G. I., Lisa, T. A. y Domenech, C. E. 1989. Choline and betaine as inducer agents of *Pseudomonas aeruginosa* phospholipase C activity in high phosphate medium. *FEMS Letts.* **57**, 335-338.
- Lundquist R. y Olivera, B. M. 1971. Pyridine Nucleotide Metabolism in *Escherichia coli*. I. Exponential growth. *J. Biol. Chem.* **246**, 1107-1116.
- Lundquist R. y Olivera, B. M. 1973. Pyridine Nucleotide Metabolism in *Escherichia coli*. II. Niacin starvation. *J. Biol. Chem.* **248**, 5137-5143.
- Ma, J. F., Hagner, P. W., Howell, M. L., Phibbs, P. V. y Hassett, D. J. 1998. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa zwf* gene encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase, an enzyme important in resistance to methyl viologen (paraquat). *J. Bacteriol.* **180**, 1741-1749.
- MacGibbon, K. H., Motion, L. R., Crow., K. E., Buckley, P. D. y Blackwell, L. F. 1979. purification and properties of sheep-liver aldehyde dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* **96**, 585-595.
- Marquardt, D. W. 1963. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431-441.

McCue, K. F. y Hanson, A. D. 1992. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant Mol. Biol.* **18**, 1-11.

Measures, J. C. 1975. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**, 398-400.

Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y. y Yamada, H. 1980. Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpon didymum* M-1. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 3015-3016.

Mori, N., Yoshida, N. y Kitamoto, Y. 1992. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Xanthomonas translucens*. *J. Ferment. Bioeng.* **73**, 352-356.

Mukerjee, N. y Pietruszko, R. 1994. Inactivation of human aldehyde dehydrogenase by isosorbide dinitrate. *J. Biol. Chem.* **269**, 21664-21669.

Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y. y Ogata K. 1975. Choline dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agr. Biol. Chem.* **39**, 1513-1514.

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

Nakamura, T., Yokota, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K. y Takabe, T. 1997. Sequence of *Oryza sativa* betaine aldehyde dehydrogenase. Submission to Swiss-Prot database (accession DHAB_ORYZA).

Ni, L., Sheikh, S. y Weiner, H. 1997. Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 18823-18826.

Niegmann, E., Schulz, A y Bartsch, K. 1992. Sequence of *E. coli* succinic semialdehyde dehydrogenase. Submission to Swiss-Prot database (accession Gabd_Ecoli).

Norlund, I. y Shingler, V. 1990. Nucleotide sequences of the meta- cleavage pathway enzymes : 2-Hyxymuconic semialdehyde dehydrogenase and 2-Hyxymuconic semialdehyde hydrolase from *Pseudomonas* CF600. *Biochim. Biophys. Acta* **1049**, 227-230.

Ostroff, R. M., Wretlind, B. y Vasil, M. L. 1990. Molecular comparison of a nonhemolytic and a hemolytic phospholipase C from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **172**, 5915-5923.

Park, I. K. y Kim, J. Y. 1998. Effects of NAD or NADP on the stability of liver and pectoral muscle enzymes in 3-acetylpyridine treated quail by heat and trypsin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **30**, 1223-1234.

Perroud, B. y Le Rudulier, D. 1985. Glycine betaine transport in of *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* **161**, 393-401.

Pesin, S. R., y Candia, O. A. 1982. Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophtalmol. Vis. Sci.* **22**, 651-659.

Petronini, P. G., de Angelis, E. M., Borghetti, P., Borghetti, A. F. y Wheeler, K. P. 1992. Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochem. J.* **282**, 69-73.

Pocard, J. A., Vincent, N., Boncompagni, E., Poggi, M. C., Smith, L. T. y Le Rudulier, D. 1997a. Sequence of *Rhizobium meliloti* betaine aldehyde dehydrogenase. Submission to Swiss-Prot database (accession DHAB_RHIME).

Pocard, J. A., Vincent, N., Boncompagni, E., Smith, L. T., Poggi, M. C. y Le Redulier, D. 1997b. Molecular characterization of the *bet* genes encoding glycine betaine synthesis in *Synorizobium meliloti* 102F34. *Microbiology* **143**, 1369-1379.

Pollard, A. y Wyn Jones, R. G. 1979. Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. *Planta* **144**, 291-298.

Racker, E. 1949. Bovine liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **177**, 883-892.

Ramirez, R. M., Prince, W. S., Bremer, E. y Villarejo, M. 1989. *In vitro* reconstitution of osmoregulated expression of *proU* of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 1153-1157.

Record, M. T. Jr., Courtenay, E. S., Cayley, D. S. y Guttman, H. J. 1998a. Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. TIBS **23**, 143-148.

Record, M. T. Jr., Courtenay, E. S., Cayley, D. S. y Guttman, H. J. 1998b. Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments. TIBS **23**, 190-194.

Rennick, B. R. 1981. Renal tubule transport of organic ions. Am. J. Physiol. **240**, F83-F89.

Rhodes D. y Hanson, A. D. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. **44**, 357-384.

Rivett, A. J. y Tipton, K. F. 1981. Kinetic Studies With Rat-Brain Succinic-Semialdehyde Dehydrogenase. Eur. J. Biochem. **117**, 187-193.

Rokenes, T. P., Lamark, T. y Stroem, A. R. 1996. DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation. J. Bacteriol. **178**, 1663-1670.

Russell, R. y Scopes, R. K. 1994. Use of hydrophobic chromatography for purification of the membrane-located choline dehydrogenase from a *Pseudomonas* strain. Bioseparation **4**, 279-284.

Sage, A. E., Vasil, A. I. y Vasil, M. L. 1997. Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. **23**, 43-56.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N. Y.

- Senkevich, S. B., Strumilo, S. A., Zavodnik, I. B. and Vinogradov, VV. 1986. Some kinetic and spectral-fluorescent properties of NADP-dependent malate dehydrogenase from bovine adrenal cortex cytoplasm. *Biokhimiya* **51**, 1534-1540.
- Severin, J. A., Wohlfarth, A. y Galinsky, E. A. 1992. The predominant role of recently discovered tetrahydropyrimidines for the osmoadaptation of halophilic eubacteria. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1629-1638.
- Sheikh, S., Li, N., Hurley, T. D. and Weiner H. 1997. The potential roles of the conserved amino acids in human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**, 18817-18822.
- Shortridge, V. D., Lazdunski, A. y Vasil, M. L. 1992. Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **6**, 863-871.
- Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T. y Le Rudulier, D. 1988. Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **170**, 3142-3149.
- Stanier, R. Y., Palleroni, N. J. y Doudoroff, M. 1966. The aerobic Pseudomonads, a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159-271.
- Steinmetz, C. G., Xie, P., Weiner, H. y Hurley, D. H. 1997. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* **5**, 701-711.
- Strasser, F., Dey, J., Eftink, R. y Plapp B. V. 1998. Activation of horse liver alcohol dehydrogenase upon substitution of tryptophan 314 at the dimer interface. *Arch. Biochem and Biophys.* **358**, 369-376.
- Styvold, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M. W., Bjornsen, T. y Stroem, A. R. 1986. Selection, mapping, and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J. Bacteriol.* **165**, 856-863.
- Swings, J., De Vos, P., Van den Mooter, M. y De Ley, J. 1981. Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophila* (Hugh 1981) comb.nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 409-413.

Takebe, I. y Kitahara, K. 1963. Levels of nicotinamide nucleotide coenzymes in lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **9**, 31-40.

Talibart, R., Jebbar, M., Gouffi, K., Pichereau, V., Gouesbet, G., Blanco, C., Bernard, T. y Pocard, J. A. 1997. Transient accumulation of glycine betaine and dynamics of endogenous osmolytes in salt-stressed cultures of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 4657-4663.

Todar, K. 1997. Bacteriology 330 Lecture Topics: *Pseudomonas aeruginosa*. Retrieved. University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology. Retrieved June 14, 1999 from World Wide Web: www.bact.wisc.edu/bact330/lecturepseudomonas.

Torunn, P. R., Lamark, T. y Stroem, A. R. 1996. DNA-binding properties of the BetI repressor protein of *Escherichia coli*: the inducer choline stimulates BetI-DNA complex formation. *J. Bacteriol.* **178**, 1663-1670.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4353.

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

Tsou, C. L. 1998. Active site flexibility in enzyme catalysis. *Ann. NY Acad. Sci.* 1-8

Valenzuela-Soto, E. M. y Muñoz-Clares, R. A. 1993. Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso ordered Bi Bi steady state mechanism. *J. Biol. Chem.* **268**, 23818-23824.

Valenzuela-Soto, E. M. y Muñoz-Clares, R. A. 1994. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit. *J. Plant Physiol.* **143**, 145-152.

- Vedadi, M., Vrielink, A. y Meighen, E.** 1997. Involvement of conserved residues, 229 and 234, of *Vibrio harveyi* aldehyde dehydrogenase in activity and nucleotide binding. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **238**, 448-451.
- Vojtechová, M., Hanson, A. D. y Muñoz-Clares, R. A.** 1997. Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of dimethylsulfonylpropionaldehyde to dimethylsulfonylpropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**, 81-88.
- Wang, X. y Weiner, H.** 1995. Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (Class 2) aldehyde dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 237-243.
- Weigel, P., Weretilnyk, E. A., y Hanson, A. D.** 1986. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* **82**, 753-759.
- Weiner, H., Farrés, J., Rout, U. J., Wang, X. y Zheng, Ch. F.** 1995. Site directed mutagenesis to probe for active site components of liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. In: Weiner, H. *et al.*, (eds.) *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 5*. Plenum Press, New York. pp. 1-7.
- Weretilnyk, E. A. y Hanson, A. D.** 1989. Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves. Purification, *in vitro* translation of the mRNA, and regulation by salinity. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**, 56-63.
- Weretilnyk, E. A. y Hanson, A. D.** 1990. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2745-2749.
- Whatmore, A. M. y Reed, R. H.** 1990. Determination of turgor pressure in *Bacillus subtilis*: a possible role for K⁺ in turgor regulation. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2527-2535.
- Wimpenny, J. W. T. y Firth, A.** 1972. Levels of nicotinamide adenine dinucleotide and reduced nicotinamide adenine dinucleotide in facultative bacteria and the effect of oxygen. *J. Bacteriol.* **111**, 24-32.

Wood, A. J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R. J. y Goldsbrough, P. B. 1996. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum. Molecular cloning and expression of two related genes. *Plant Physiol.* **110**, 1301-1308.

Wright, J. R., y Clements, J. A. 1987. Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**, 426-444.

Xiao, G., Zhang, G., Liu, F. y Chen, S. 1995. Sequence of *Atriplex hortensis* betaine aldehyde dehydrogenase. Submission to Swiss-Prot database (accession DHAB_ATRHO).

Yancey, P. H., Clarck, M. E., Hand, S. C., Bowler, R. D. y Somero, G. N. 1982. Living with water stress: evolution of smolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.

Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. C. y Chang, Ch. 1998. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur. J. Biochem.* **251**, 549-557.

APÉNDICE 1

Suplemento del artículo II.

“Patrones de velocidad inicial y de inhibición de las reacciones de BADH dependientes de NAD^+ y NADP^+ ”

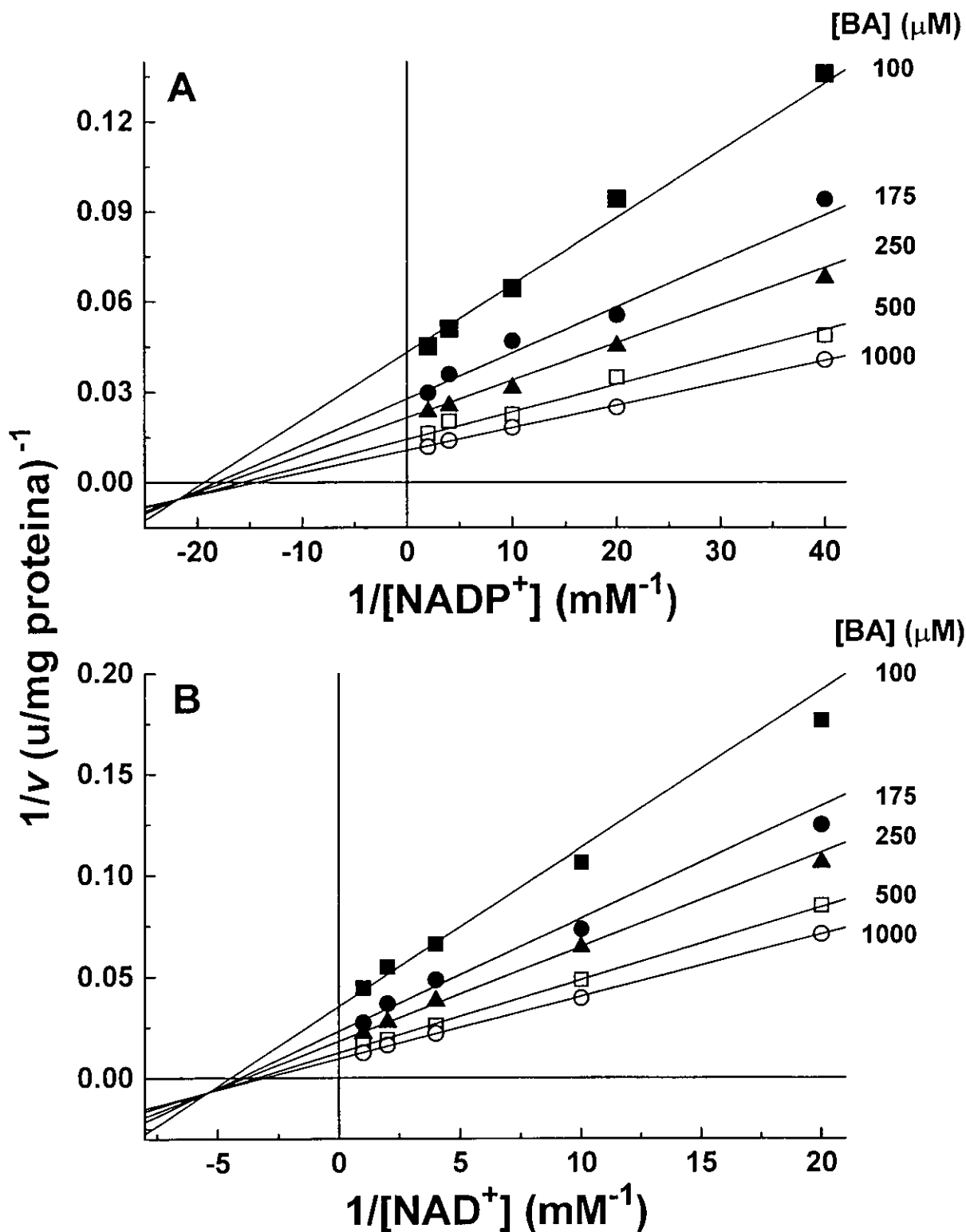


Figura 1. Patrones de velocidad inicial de las reacciones de BADH de *P. aeruginosa* dependientes de NADP⁺ y NAD⁺. NADP⁺ (A) y NAD⁺ (B) se variaron de 25 a 500 y de 50 a 1000 μM, respectivamente, a las concentraciones fijas de betaina aldehído que se indican a la derecha de las líneas (μM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 8.0, a 30 °C. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a la ecuación 2 del Artículo II.

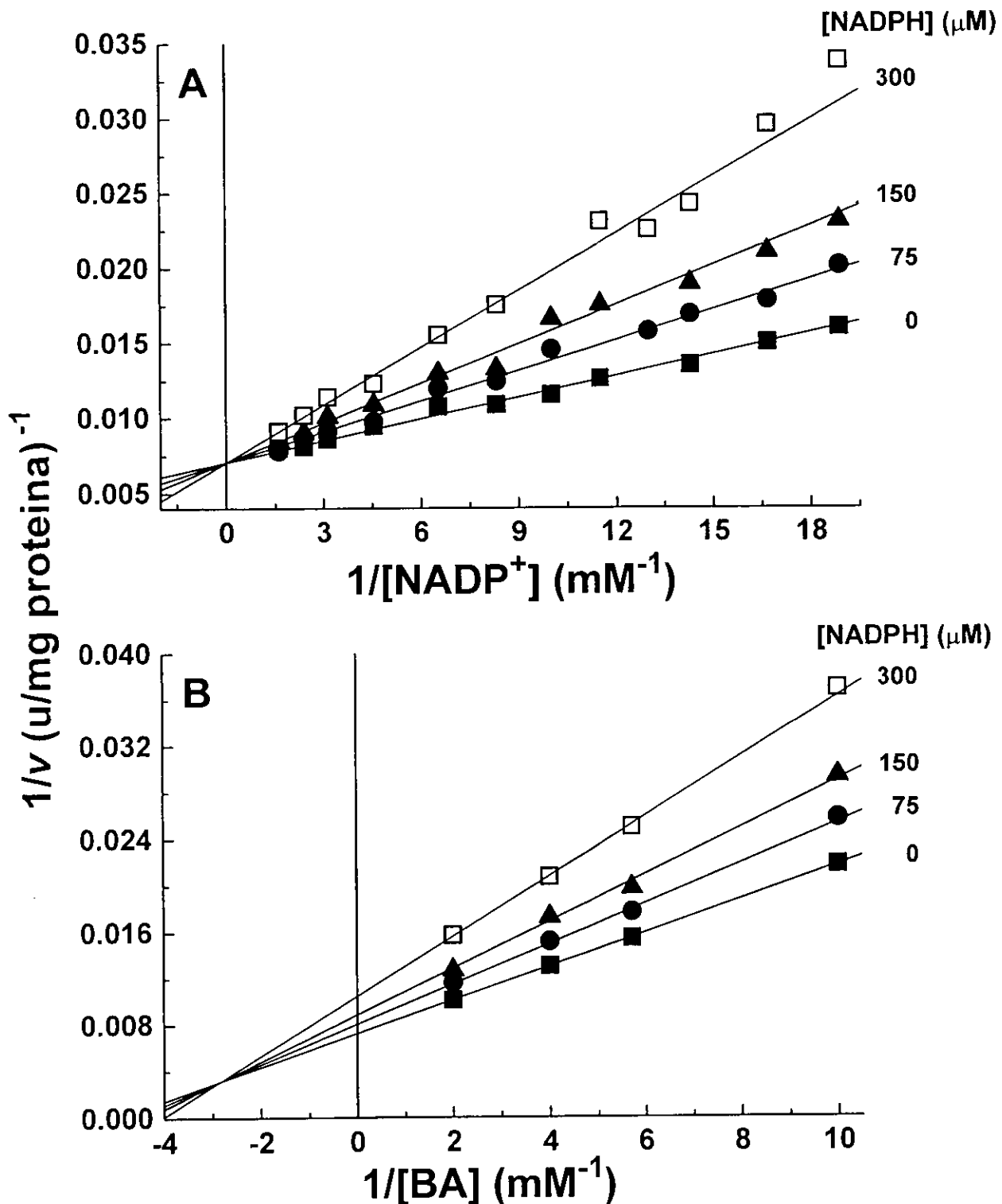


Figura 2. Patrones de inhibición por NADPH en la reacción de BADH dependiente de NADP⁺. (A) Betaina aldehído se agregó a una concentración no saturante (500 μM) y el NADP⁺ se varió de 53 a 621 μM a las concentraciones fijas de NADPH que se indican a la derecha de las líneas (μM). (B) NADP⁺ fue fijado a 100 μM y betaina aldehído se varió en un intervalo de 100 a 500 μM, a las concentraciones fijas de NADPH que se indican a la derecha (μM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 8.0, a 30 °C. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a las ecuaciones 4 y 5, respectivamente, del Artículo II.

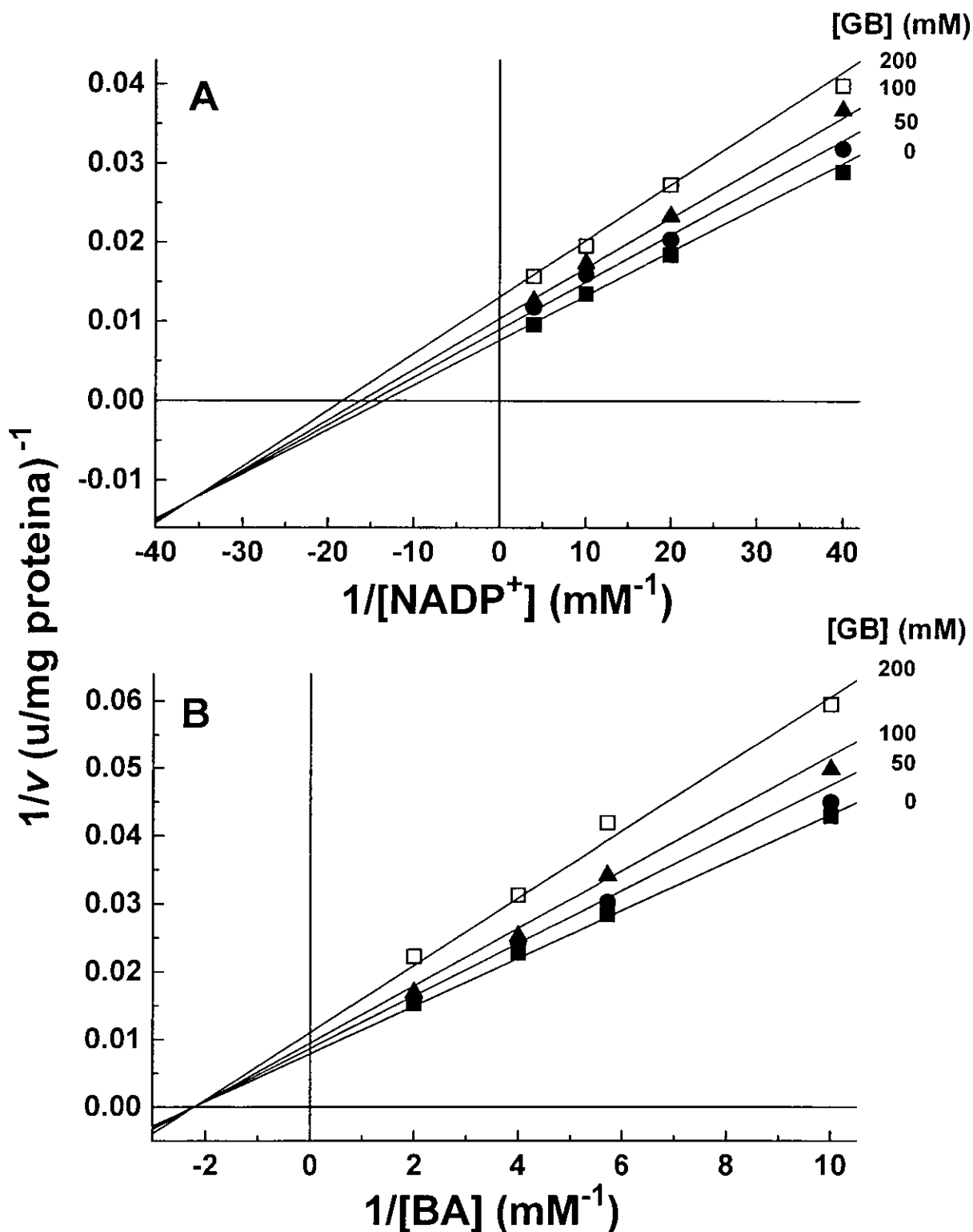


Figura 3. Patrones de inhibición por glicina betaina en la reacción de BADH dependiente de NADP⁺. (A) Betaina aldehído se agregó a una concentración no saturante (175 μM) y el NADP⁺ se varió de 25 a 250 μM a las concentraciones fijas de glicina betaina que se indican a la derecha de las líneas (mM). (B) NADP⁺ fue fijado a 100 μM y betaina aldehído se varió en un intervalo de 100 a 500 μM , a las concentraciones fijas de glicina betaina que se indican a la derecha (mM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 8.0, a 30 °C. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a la ecuación 5 del Artículo II.

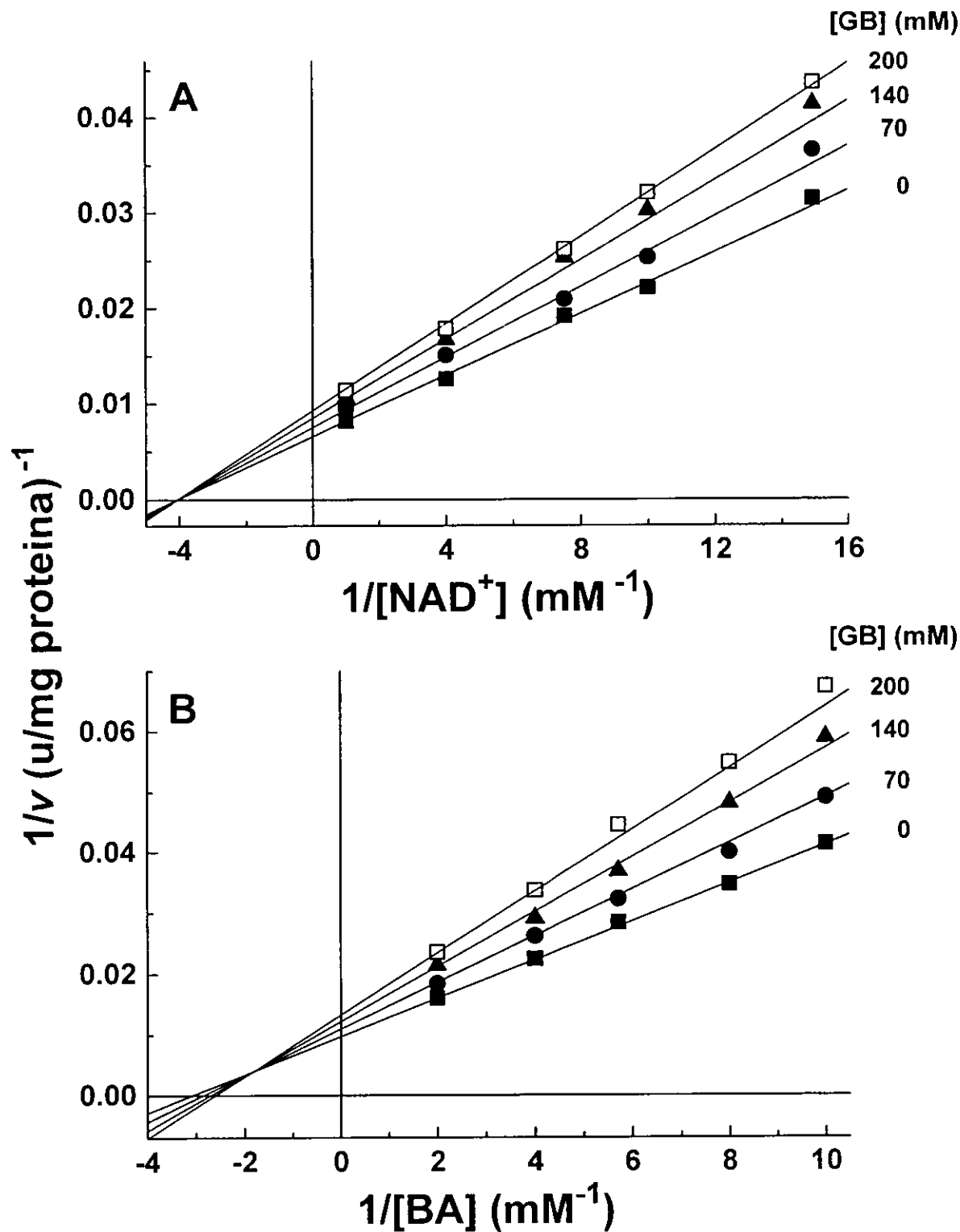


Figura 4. Patrones de inhibición por glicina betaína en la reacción de BADH dependiente de NAD^+ . (A) Betaína aldehído se agregó a una concentración no saturante ($150\ \mu M$) y el NAD^+ se varió de 67 a $1000\ \mu M$ a las concentraciones fijas de glicina betaína que se indican a la derecha de las líneas (mM). (B) NAD^+ fue fijado a $500\ \mu M$ y la betaína aldehído se varió en un intervalo de 100 a $500\ \mu M$, a las concentraciones fijas de glicina betaína que se indican a la derecha (mM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 8.0, a $30\ ^\circ C$. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a la ecuación 5 del Artículo II.

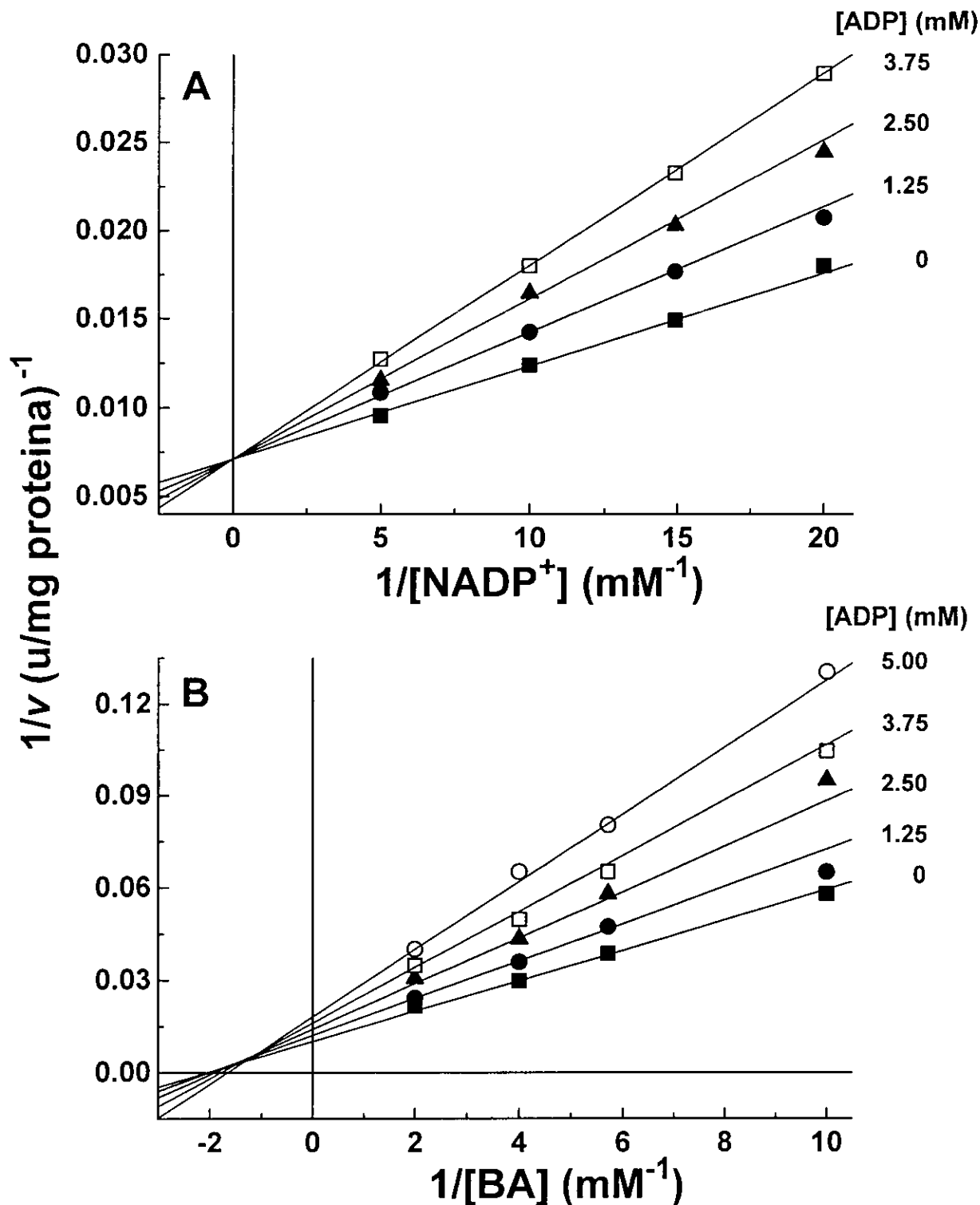


Figura 5. Patrones de inhibición por ADP en la reacción de BADH dependiente de $NADP^+$. (A) Betaina aldehído se agregó a una concentración no saturante ($500\ \mu M$) y el $NADP^+$ se varió de 50 a $200\ \mu M$ a las concentraciones fijas de ADP que se indican a la derecha de las líneas (mM). (B) $NADP^+$ fue fijado a $100\ \mu M$ y la betaina aldehído se varió en un intervalo de 100 a $500\ \mu M$, a las concentraciones fijas de ADP que se indican a la derecha (mM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio $100\ mM$, $pH\ 8.0$, a $30\ ^\circ C$. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a las ecuaciones 4 y 6, respectivamente, del Artículo II.

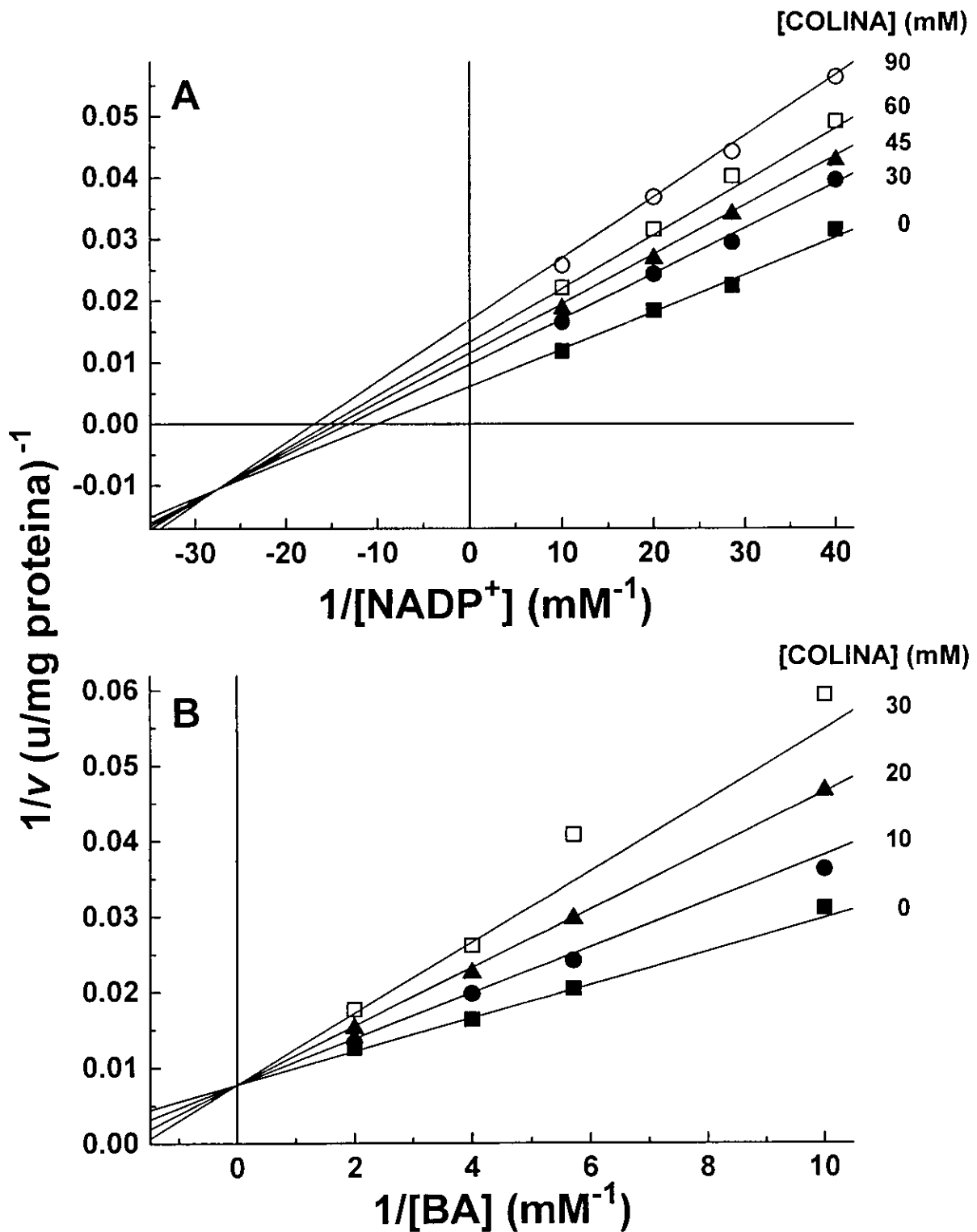


Figura 6. Patrones de inhibición por colina en la reacción de BADH dependiente de $NADP^+$. (A) Betaina aldehído se agregó a una concentración no saturante ($500 \mu M$) y el $NADP^+$ se varió de 25 a $100 \mu M$ a las concentraciones fijas de colina que se indican a la derecha de las líneas (mM). (B) $NADP^+$ fue fijado a $100 \mu M$ y la betaina aldehído se varió en un intervalo de 100 a $500 \mu M$, a las concentraciones fijas de colina que se indican a la derecha (mM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 8.0, a $30^\circ C$. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a las ecuaciones 5 y 4, respectivamente, del Artículo II.

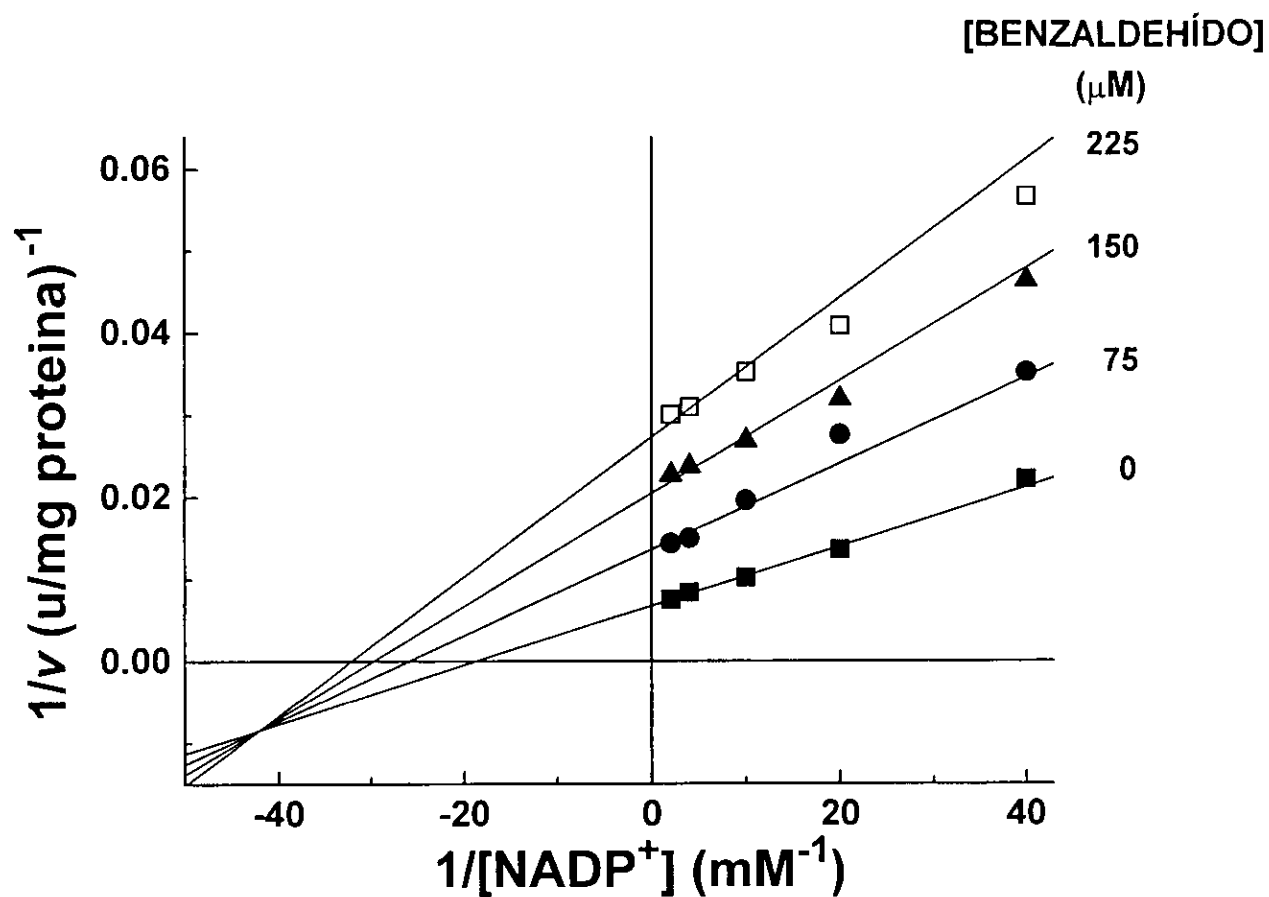


Figura 7. Patrones de inhibición por benzaldehído en la reacción de BADH dependiente de $NADP^+$. Betaina aldehído se agregó a una concentración no saturante ($500 \mu\text{M}$) y el $NADP^+$ se varió de 25 a $500 \mu\text{M}$ a las concentraciones fijas de benzaldehído que se indican a la derecha de las líneas (μM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM , $\text{pH } 8.0$, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a la ecuación 4 del Artículo II.

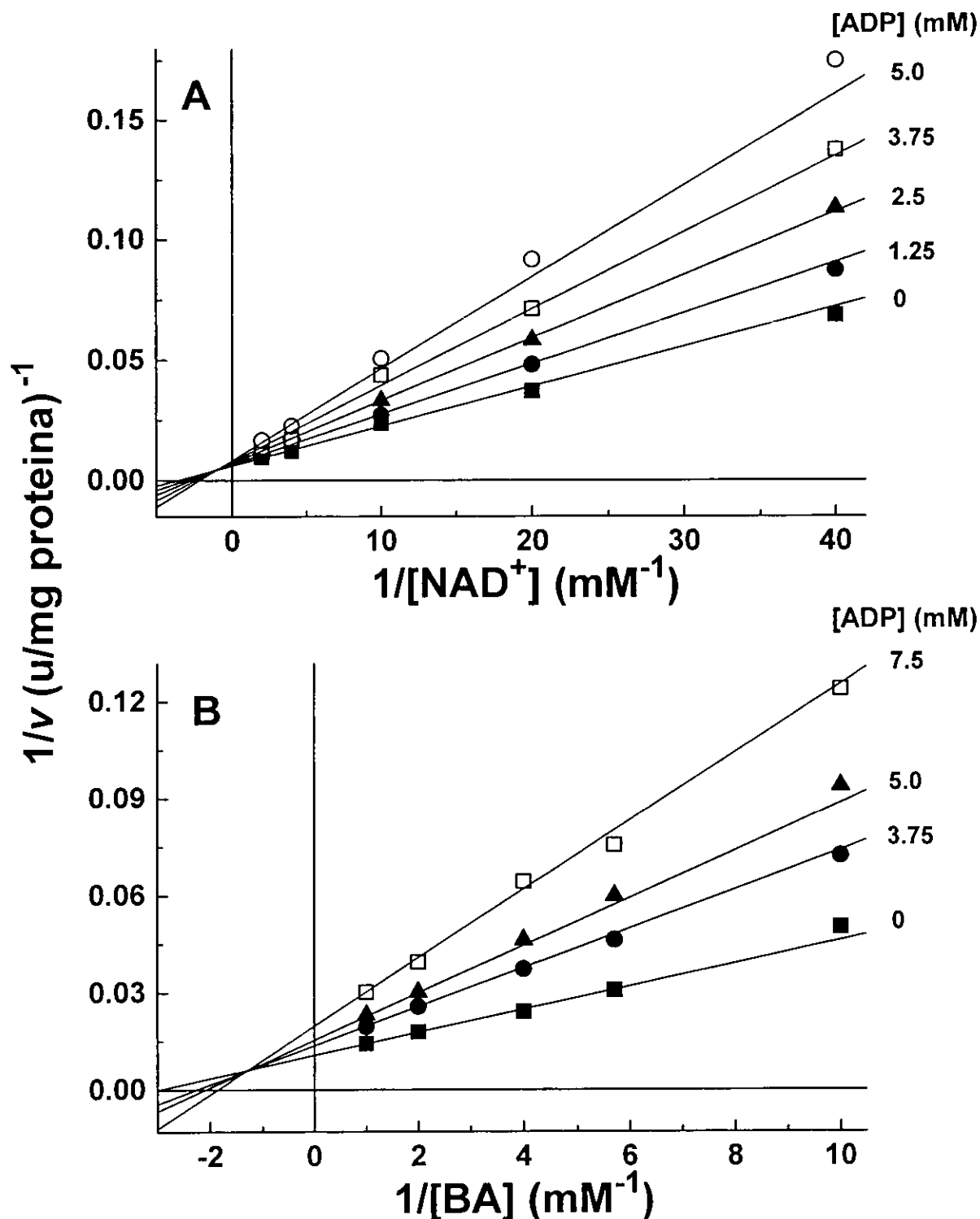


Figura 8. Patrones de inhibición por ADP en la reacción de BADH dependiente de NAD^+ . (A) Betaina aldehído se agregó a una concentración no saturante (500 μM) y el NAD^+ se varió de 25 a 500 μM y las concentraciones fijas de ADP que se indican a la derecha de las líneas (mM). (B) NAD^+ fue fijado a 500 μM y la betaina aldehído se varió en un intervalo de 100 a 1000 μM , a las concentraciones fijas de ADP que se indican a la derecha (mM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 8.0, a 30 °C. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a las ecuaciones 6 y 7, respectivamente, del Artículo II.

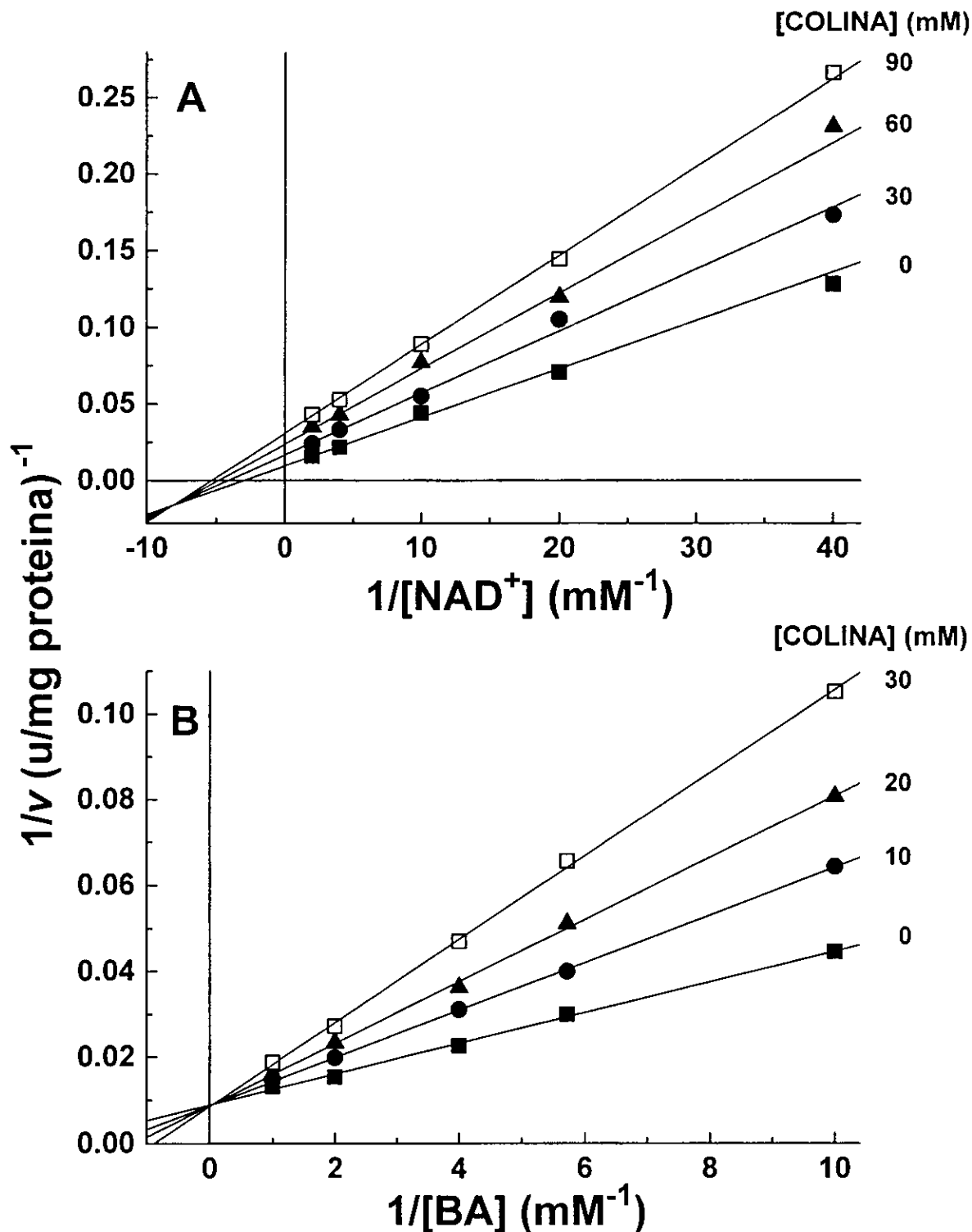


Figura 9. Patrones de inhibición por colina en la reacción de BADH dependiente de NAD^+ . (A) Betaina aldehído se agregó a una concentración no saturante ($500\ \mu M$) y el NAD^+ se varió de 25 a $500\ \mu M$ a las concentraciones fijas de colina que se indican a la derecha de las líneas (mM). (B) NAD^+ fue fijado a $500\ \mu M$ y la betaina aldehído se varió en un intervalo de 100 a $1000\ \mu M$, a las concentraciones fijas de colina que se indican a la derecha (mM). Los ensayos se realizaron en amortiguador de fosfatos de potasio 100 mM, pH 8.0, a $30\ ^\circ C$. Los puntos en las gráficas corresponden a los valores determinados experimentalmente, mientras que las líneas dibujadas a través de estos puntos fueron calculadas por el mejor ajuste global de estos datos a las ecuaciones 5 y 4, respectivamente, del Artículo II.