

00591
9



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA DE LA BETAÍNA
ALDEHÍDO DESHIDROGENASA DE *Pseudomonas aeruginosa* POR MEDIO DE
MODIFICACIÓN QUÍMICA Y MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
M. en C. LILIAN GONZÁLEZ SEGURA

MÉXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003

A



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Dra. Estela Sánchez de Jiménez
Vocal:	Dr. Armando Gómez Poyou
Vocal:	Dr. Mario Luis Calcagno Montans
Vocal:	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez
Secretario:	Dr. Marina Gavilanes Ruiz
Suplente:	Dr. Eduardo Bárzana García
Suplente:	Dra. Adela Rodríguez Romero

SUSTENTANTE

M. en C. Lilian González Segura

TUTORA

Dra. Rosario A. Muñoz Clares

COMITÉ TUTORAL

Dr. Mario L. Calcagno Montans

Dr. Guillermo Mendoza Hernández

Dra. Rosario A. Muñoz Clares

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

El trabajo experimental fue realizado en el laboratorio de Osmorregulación, Unidad de Morfología y Función, FES Iztacala, UNAM y en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, con la asesoría de la Dra. Rosario A. Muñoz Clares.

Este proyecto contó con los siguientes apoyos:

- Beca de estudios doctorales del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT (121705).
- Complemento de beca doctoral de la Dirección de Estudios de Posgrado, DGEP, UNAM.
- Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado, PAEP (103320, 103322, 203354).
- Financiamiento del CONACYT (proyecto 2552P-N) y de la Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM (DGAPA-IN 210198, DGAPA-IN 221001).

A DIOS, por ser tan generoso

D

A mis padres **RAMÓN** y **EMELIA**

A ATALO

A mis hermanas **IVONNE**, **MARÍA CRUZ** a mi cuñado **FELIPE**

A mis sobrinos **TANIA**, **FRANCISCO** y **MONTSERRAT**

E

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares, por su esmero y dedicación tanto en mi formación académica como en la dirección de esta tesis.

A las Dras. Estela Sánchez de Jiménez, Marina Gavilanes Ruiz y Adela Rodríguez Romero; y a los Dres. Armando Gómez Poyou, Mario Luis Calcagno Montans, Juan Pablo Pardo Vázquez y Eduardo Bárzana García, sinodales del presente trabajo, por sus valiosos comentarios.

A los miembros del Comité Tutorial Ampliado: Dra. Rosario A. Muñoz Clares, Dr. Mario L. Calcagno Montans, Dr. Guillermo Mendoza Hernández, Dr. Daniel A. Fernández Velasco y Dr. Juan Luis Rendón Gómez.

Al Dr. Roberto Velasco García, por haberme iniciado en el trabajo de esta interesante enzima.

Al Dr. Rafael Moreno, por permitirme estar en su laboratorio durante el paro de la UNAM.

Al Dr. Sergio González Moreno, por las facilidades otorgadas para llevar a cabo los experimentos de fluorescencia.

Al Dr. Enrique Rudiño Piñera, por su apoyo en el modelaje de la estructura de la enzima.

A los Dres. Alejandro Sosa Peinado, Samuel Lara González y Gabriela Montero Morán, por las facilidades que me otorgaron para realizar los experimentos de difracción circular.

Al IBB. Lenin Domínguez Ramírez, por facilitarme su programa de deconvolución.

Al Biól. Carlos Mújica Jiménez, por brindarme siempre su ayuda.

A Leticia García Gutiérrez, por estar siempre dispuesta a ayudar a todos los alumnos del posgrado, por ser muy atenta y paciente con nosotros.

A Adelina González, por su cooperación.

A la Biól. Llarai, por su amistad sincera.

A Adelaida Díaz, por su amistad y su apoyo.

A mis compañeros del posgrado: José, Gloria, Horacio, Hugo, Nora, Irma, Miriam y Omar.

F

A mis compañeros de laboratorio de Osmorregulación de la FES Iztacala y del laboratorio 102 de la Facultad de Química.

A mis compañeros de la licenciatura Ivonne, Alicia, Arturo, Abigail, Yolanda, Claudia, Martha, y Candelaria, por su amistad.

A mi familia. De forma muy especial a mi mamá por su amor, paciencia y comprensión y a mi papá, por darme un ejemplo de valentía y coraje para afrontar todas las adversidades, por sus ganas de vivir y seguir adelante.

A mi familia política, por su apoyo en los momentos difíciles.

A Atalo, por estar siempre conmigo apoyándome.

A todas aquellas personas que influyeron en mi formación académica y personal, así como a todos los que de una u otra manera participaron en la elaboración de este trabajo.

A la UNAM, por mi formación académica.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM por permitirme realizar mis estudios de posgrado y a sus profesores por su invaluable ayuda.

Al CONACYT y a la DGEP, por haberme otorgado las becas para la realización de mis estudios de Doctorado.

Abreviaturas

As	Arsenito
BA	Betaína aldehído
BAL	2, 3-dimercaptopropanol
BADH	Betaína aldehído deshidrogenasa
DTNB	Ácido 5, 5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
MMS	Ácido metilmetanotiosulfonato
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
SDS	Dodecilsulfato de sodio

CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
I. INTRODUCCIÓN	7
II. ANTECEDENTES	9
II.1. LA ENZIMA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA	9
II.1.1. Función biológica	10
II.1.1.1. Función biológica de la BADH en <i>P. aeruginosa</i>	10
II.1.2. Regulación de la expresión génica y de la actividad de BADH	14
II.1.3. Estructura primaria	15
II.1.4. Estructura terciaria y cuaternaria	17
II.1.5. Estabilidad	19
II.1.6. Propiedades cinéticas	20
II.1.6.1. Especificidad por los sustratos	20
II.1.6.2. Mecanismo cinético	21
II.1.7. Mecanismo químico de la reacción catalizada	23
II.1.7.1. Formas de activación de la cisteína catalítica	25
II.2. PAPEL DE LAS CISTEÍNAS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS	27
II.3. LA MODIFICACIÓN QUÍMICA Y LA MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA	30
II.3.1. Modificación química de cisteínas	31
II.3.2. Modificación química de las cisteínas de las aldehído deshidrogenasas	35
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
IV. HIPÓTESIS	39
V. OBJETIVOS	40
V. 1. OBJETIVO GENERAL	40
V. 2. OBJETIVOS PARTICULARES	40
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	41
VI.1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS ENZIMAS BADH SILVESTRE Y MUTANTES DE <i>P. aeruginosa</i> POR As-BAL	41
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
VII. 1. REACTIVIDAD DE LA CISTEÍNA ESENCIAL DE LA BADH DE <i>P.</i> <i>AERUGINOSA</i>	42
VII.2. MODULACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE LA CISTEÍNA ESENCIAL POR LOS LIGANDOS	48
VII.2.1. Artículo I	54
"Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> "	54

VII.2.2. Artículo II.	67
“Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Amaranthus hypochondriacus</i> leaves affecting the reactivity of the catalytic thiol”	67
VII. 3. PAPEL DE LAS CISTEÍNAS NO ESENCIALES DE LA BADH DE <i>P. AERUGINOSA</i>	77
VII.3.1. Papel en la catálisis.....	78
VII.3.2. Papel en la regulación de la actividad	78
VII.3.3. Papel en la estabilidad	84
VII.3.4. Artículo III.....	88
(Manuscrito en preparación)	88
"Analysis by chemical modification and site-directed mutagenesis of the role of non-essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . C439 is an important residue for enzyme stability "	88
VIII. CONCLUSIONES	131
IX. PERSPECTIVAS	132
X. REFERENCIAS.....	133
APÉNDICE A (ARTÍCULO DE REVISIÓN)	148
PAPEL DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS.....	148

RESUMEN

La betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) cataliza la oxidación irreversible dependiente de NAD(P)^+ de betaína aldehído a glicina betaína. En *Pseudomonas aeruginosa* esta reacción participa en la asimilación de carbono y nitrógeno cuando la bacteria está creciendo en colina o sus precursores. La BADH de *P. aeruginosa* es un homotetrámero, dímero de dímeros, con 4 residuos de cisteína por subunidad, uno de los cuales, C286, es un residuo esencial para la catálisis, que realiza un ataque nucleofílico sobre el sustrato aldehído formando un tiohemiacetal como intermediario covalente. El objetivo de nuestro trabajo fue investigar el papel que juegan las cisteínas en la actividad y estabilidad de esta enzima mediante la modificación química y la mutagénesis sitio-dirigida. En la primera parte de la tesis abordamos el estudio de la reactividad de la cisteína esencial. La dependencia del pH de los valores de la constante de velocidad de segundo orden de la inactivación de la BADH por el metil metanotiosulfonato (MMTS) indicó que a bajos valores de pH esta cisteína existe como tiolato, lo cual puede deberse a la formación de un par iónico con un residuo cargado positivamente. Si se supone que este es el caso, los dos valores de pK_a macroscópicos estimados fueron de 8.6 y de 4.0 para el tiolato libre y para el tiolato cuando forma el par iónico, respectivamente. La baja reactividad hacia el MMTS de estas dos formas del tiolato sugiere que existe una inhibición estérica por la estructura de la proteína. La unión de los dinucleótidos induce un aumento rápido en la reactividad del tiolato, seguida de un cambio lento hasta una forma poco reactiva. El sustrato betaína aldehído también induce un cambio lento hacia una forma de la enzima con un tiol menos reactivo. Parece ser que para ganar protección contra la oxidación sin comprometer la eficiencia catalítica, la BADH de *P. aeruginosa* ha desarrollado un mecanismo complejo que involucra una serie de rearrreglos en el sitio activo para ajustar la reactividad del tiol esencial de acuerdo con la disponibilidad de los dinucleótidos y del sustrato. En la segunda parte de la tesis estudiamos el papel de las cisteínas no esenciales en la actividad y estabilidad. Se obtuvieron y sobreexpresaron las mutantes C353A, C377A, C439A y C439S. Estas mutantes fueron purificadas con el mismo procedimiento que se utiliza para la enzima silvestre, todas se obtuvieron activas presentando valores de k_{cat} y k_{cat}/K_m semejantes a los de la enzima silvestre, lo que indica que ninguna de estas cisteínas está participando ni en la unión de los sustratos ni en la catálisis, ni están involucradas en la modulación de esta reactividad por los dinucleótidos. Sin embargo, los estudios de sensibilidad a altas temperaturas, a la dilución, a la exposición a bajas concentraciones de K^+ y a la urea de las BADHs silvestre y mutadas indicaron que el residuo C439 era importante para la estabilidad. De acuerdo con el modelo tridimensional construido en este trabajo de tesis basándonos en la secuencia de aminoácidos de la BADH de *P. aeruginosa* y en la estructura tridimensional obtenida por difracción de rayos X de la BADH de hígado de bacalao, la C439 está situada en un región muy conservada en la interfase entre monómeros en una unidad dimérica y podría estar formando un puente de hidrógeno con la K477 de la otra subunidad, o bien participando en una serie de interacciones hidrofóbicas entre los dos monómeros.

ABSTRACT

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8) catalyzes the irreversible, NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine. In *Pseudomonas aeruginosa* this reaction participates in the assimilation of carbon and nitrogen from choline or choline precursors. BADH from *P. aeruginosa* is a homotetramer, dimer of dimers, with 4 cysteine residues per subunit, one of which, C286, is a catalytic residue, involved in the formation of the intermediate thiohemiacetal with the aldehyde substrate. The main goal of this thesis was to investigate the role of the cysteines in the activity and stability of this enzyme by means of chemical modification and site-directed mutagenesis. In the first part of this work we studied the reactivity of the essential cysteine. The pH dependence of the observed second-order rate constant of BADH inactivation by methyl methanethiosulphonate (MMTS) indicated that at low pH values the essential cysteine residue exists as thiolate, possibly due to the formation of an ion pair with a positively charged residue. Assuming that this is the case, the estimated macroscopic pK_a values are 8.6 and 4.0 for the free and ion-pair-forming thiolate, respectively. The low reactivity towards MMTS of both thiolate forms suggests a considerable steric inhibition by the structure of the protein. Binding of the dinucleotides rapidly induced a significant and transitory increment of thiolate reactivity, followed by a relative slow change to an almost unreactive form. Similarly, binding of betaine aldehyde elicited a conformational change to a form possessing a less reactive thiolate. Thus, it seems that in order to gain protection against oxidation without compromising catalytic efficiency, BADH from *P. aeruginosa* has evolved a complex mechanism, involving several conformational rearrangements of the active site, to suit the reactivity of the essential thiol to the availability of coenzyme and substrate. In the second part of this thesis, we studied the role of the non-essential cysteines. With this aim, we obtained and overexpressed the following mutants: C353A, C377A, C439A and C439S. All of them were purified by the same procedure used for the wild type BADH. The mutants were fully active with k_{cat} and k_{cat}/K_m values similar to those of wild-type BADH. These results indicated that the non-essential cysteines residues are not involved in any critical interaction necessary for either substrate binding or catalysis. Neither do they affect the reactivity of the catalytic cysteine nor are they involved in the modulation of this reactivity by dinucleotides. The stability to high temperatures, to dilution, to exposure to low K⁺ concentration and to urea demonstrated that C439 is important for BADH stability. The three dimensional model of BADH from *P. aeruginosa*, constructed in this work on the basis of the known crystal structure of cod liver BADH, showed that C439 is located in a well conserved region at the interphase between two monomers forming a dimeric unit. C439 could form either a hydrogen bond with K477 from the other subunit, or participate in a series of hydrophobic interactions between the two monomers.

I. INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los organismos en los que se ha estudiado, la función de la enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH) es catalizar el último paso en la síntesis del osmoprotector glicina betaína. En el patógeno humano, la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, esta reacción es requerida para el catabolismo de la colina o de sus precursores (fosfatidilcolina, fosforilcolina y acetilcolina) cuando la bacteria crece en estos compuestos como única fuente de carbono y nitrógeno.

La actividad de la BADH parece ser crucial para el crecimiento de la bacteria bajo las condiciones existentes en los tejidos que infecta: la abundancia de colina o sus precursores y el estrés osmótico. Por lo tanto, parece ser un sitio de acción adecuado para agentes antimicrobianos. El hallazgo de una mutante de *P. aeruginosa* deficiente en la actividad de BADH que no es capaz de crecer en colina ni en colina más glicina betaína, debido al efecto tóxico de la betaína aldehído que se acumula en la mutante cuando la colina está presente, apoya esta sugerencia. La inhibición de la enzima BADH podría tener un doble efecto deletéreo sobre la bacteria si está creciendo a expensas de colina o de sus precursores, ya que por un lado el crecimiento se detendría al impedirle la obtención de carbono, nitrógeno y energía y, por otro, la bacteria acumularía un compuesto sumamente tóxico, como la betaína aldehído.

Dada la alta resistencia de *P. aeruginosa* a los antibióticos, es de desear el diseño de nuevos agentes terapéuticos contra este patógeno oportunista. Sin embargo, el desarrollo de inhibidores de la BADH, potenciales agentes antimicrobianos, requiere de un conocimiento lo más completo posible de la enzima. Este trabajo forma parte de los esfuerzos de nuestro grupo en este sentido.

La BADH pertenece a la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas, enzimas que poseen un residuo de cisteína esencial que es el nucleófilo que ataca al sustrato aldehído formando el intermediario covalente, un tiohemiacetal. En estudios previos en nuestro laboratorio se confirmó la existencia de una cisteína esencial para la actividad de la BADH de *P. aeruginosa*. Además de ésta, la BADH de *P. aeruginosa* tiene otros tres residuos de cisteína por subunidad y todos ellos se encuentran reducidos en la enzima nativa.

Debido al interés por incrementar el conocimiento sobre el funcionamiento de esta interesante enzima y a la importancia que tiene la identificación de aminoácidos claves para la función o la estabilidad en la búsqueda o diseño de inhibidores específicos de BADH, que pudieran utilizarse para el desarrollo de fármacos contra *P. aeruginosa*, decidimos llevar a cabo un estudio a fondo sobre el papel que juegan las cisteínas en esta enzima. Por esto, estudiamos los factores que modulan la reactividad de la cisteína esencial e investigamos el papel de las cisteínas no esenciales en la actividad y la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*.

II. ANTECEDENTES

II.1. LA ENZIMA BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA

La enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH, betaína aldehído: NAD oxidorreductasa EC 1.2.1.8) pertenece a la superfamilia de las aldehído deshidrogenasas. Cataliza la oxidación, irreversible bajo las condiciones experimentales, de la betaína aldehído, de acuerdo con la siguiente reacción:

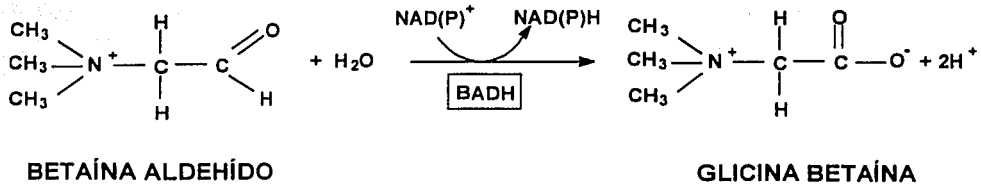


Figura 1. Reacción catalizada por la BADH

La BADH se encuentra ampliamente distribuida en diversos organismos. Ha sido purificada parcialmente a partir de las mitocondrias del tejido cardiaco del cangrejo *Limulus polyphemus* (Dragolovich y Pierce, 1994) y hasta homogeneidad a partir de hígado de humano (Kurys *et al.*, 1989), de riñón de cerdo (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998), de hígado de rata (Chern y Pietruszko, 1999), de hojas de espinaca (Arakawa *et al.*, 1987; Weretilnyk y Hanson, 1989), de hojas de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), del hongo *Cylindrocarpon didymum* (Mori *et al.*, 1980) y de las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 1999), *Escherichia coli* (Falkenberg y Strom, 1990), *Xanthomonas translucens* (Mori *et al.*, 1992), *Bacillus subtilis* (Boch *et al.*, 1997) y *Arthrobacter globiformis* (Mori *et al.*, 2002).

II.1.1. Función biológica

La función más ampliamente conocida de la BADH es la síntesis de glicina betaína. En mamíferos se ha reportado que la glicina betaína puede servir como donador de metilos en la biosíntesis de metionina (Du Vigneaud *et al.*, 1946) y como osmoprotector (Petronini *et al.*, 1992; Biggers *et al.*, 1993). Además, se ha propuesto que la BADH está involucrada en el metabolismo de los aminoaldehídos (Kurys *et al.*, 1989) y de las poliaminas (Ambroziak y Pietruszko, 1991).

En algunas plantas superiores, bajo condiciones de estrés osmótico, la BADH participa en la síntesis y acumulación de glicina betaína, uno de los más eficientes osmoprotectores u osmolitos compatibles conocidos, (Wyn Jones y Storey, 1981; Rhodes y Hanson, 1993). Recientemente se ha reportado que en ciertas plantas la BADH también está involucrada en la biosíntesis del osmoprotector dimetilsulfoniopropionato (Vojtechova *et al.*, 1997b; Trossat *et al.*, 1996) y en el metabolismo de poliaminas (Trossat *et al.*, 1997).

En algunas bacterias, como *E. coli* y *B. subtilis*, la BADH participa en la síntesis y acumulación del osmoprotector glicina betaína bajo estrés osmótico, la cual no es metabolizada posteriormente (Imhoff y Rodríguez-Valera, 1984; Le Rudulier y Bouillard, 1983; Yancey *et al.*, 1982; Bernard *et al.*, 1986; Landfald y Strom, 1986; Smith *et al.*, 1988). En otras, como *Sinorhizobium meliloti*, *X. translucens* y *P. aeruginosa*, la glicina betaína es un intermediario metabólico, ya que esta enzima participa en el catabolismo de la colina cuando las bacterias crecen en colina o sus precursores como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Nagasawa *et al.*, 1976; Smith *et al.*, 1988; Mori *et al.*, 1992).

II.1.1.1. Función biológica de la BADH en *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo gram negativo, patógeno oportunista, que provoca infecciones en personas inmunodeprimidas, en pacientes con fibrosis quística, cáncer o SIDA y en personas que han sufrido quemaduras muy severas (Bergen y Shelhamer, 1996; Govan y Deretic, 1996; Bradley, 1997; Todar, 1997). Este patógeno invade principalmente el pulmón (Reynolds y Fick, 1980; Pier, 1985), las vías urinarias y el ojo (Geddes, 1980), así

como las heridas causadas por quemaduras (Pruitt, 1980). En pacientes con fibrosis quística, *P. aeruginosa* coloniza el tracto respiratorio. Esta bacteria produce un polisacárido mucóide conocido como alginato, que le permite no sólo resistir al ataque del sistema inmune y adherirse a los pulmones, sino que también funciona como una cápsula altamente protectora, que hace a esta bacteria muy resistente a los antibióticos (Vaca y Cervantes-Pacheco, 1988).

P. aeruginosa es capaz de crecer en colina o precursores de colina como única fuente de carbono, nitrógeno y energía (Nagasawa *et al.*, 1976). Un paso obligado en el metabolismo de estos compuestos es la reacción catalizada por la BADH, como se muestra en la Figura 2.

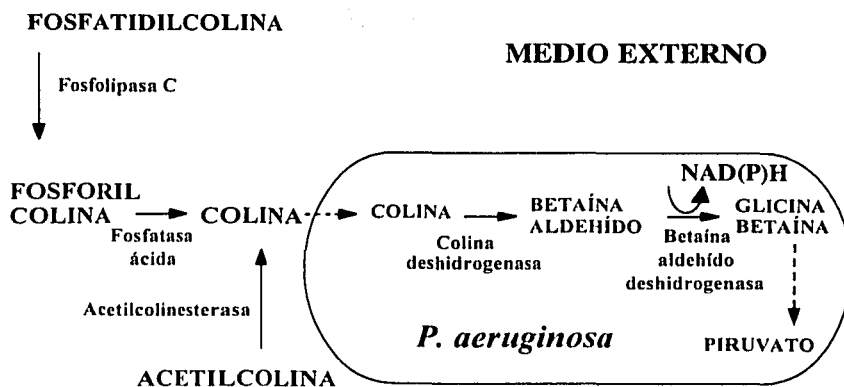


Figura 2. Síntesis y metabolismo de la glicina betaína en *P. aeruginosa*

En esta bacteria no se conoce aún la ruta por la que se degrada la glicina betaína hasta piruvato, pero ésta podría ser semejante a la que se ha encontrado en *S. meliloti* (Fig. 3) (Smith *et al.*, 1988).

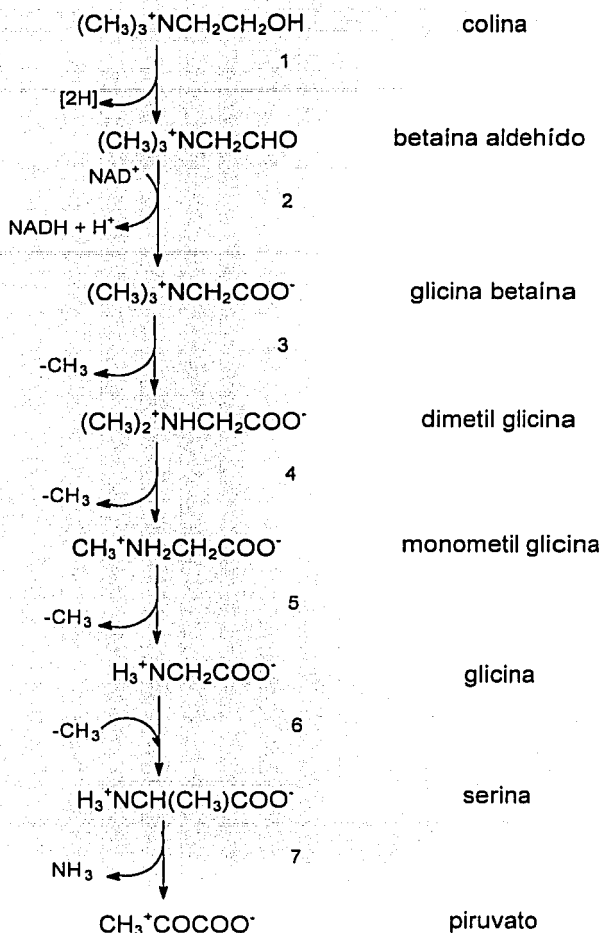


Figura 3. Ruta propuesta para el metabolismo de la colina hasta piruvato en *S. meliloti* (Smith *et al.*, 1988). Las enzimas que catalizan las reacciones son las siguientes: 1, colina oxidasa; 2, betaína aldehído deshidrogenasa; 3, glicina betaína transmetilasa; 4, dimetil glicina deshidrogenasa; 5, monometil glicina deshidrogenasa; 6, serina transhidroximetilasa; 7, serina deshidratasa.

Esta ruta metabólica es equivalente a la de la vía de Entner-Duodoroff de la degradación de la glucosa (Hunt y Phibbs, 1983) que tiene lugar cuando la bacteria crece en glucosa, ya que no posee la enzima 6-fosfofructocinasa (Lessie y Phibbs, 1983) y usa la glucosa-6-fosfato

deshidrogenasa para metabolizar a la glucosa. Al igual que la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, la BADH de *P. aeruginosa* juega un papel anfibólico, produciendo NADH o NADPH, según las necesidades metabólicas de la bacteria (Velasco-García *et al.*, 2000). *P. aeruginosa* es capaz de crecer bajo estrés osmótico, particularmente en la presencia de glicina betaína o de los compuestos que la producen, fosfatidilcolina, acetilcolina, fosforilcolina o colina (D'Souza-Ault *et al.*, 1993; Lisa *et al.*, 1994). Por tanto, la glicina betaína parece jugar un papel doble en *P. aeruginosa*, como osmoprotector y como intermediario metabólico.

En los sitios de infección de *P. aeruginosa* están presentes condiciones de estrés osmótico, así como compuestos precursores de la glicina betaína (Pepsin y Candia, 1982; Rennick, 1981). En el pulmón la fosfatidilcolina constituye aproximadamente un 70% del total del surfactante (Wright y Clemens, 1987). En el ojo humano la invasión de esta bacteria parece estar facilitada por la presencia de concentraciones altas de acetilcolina en el epitelio de la córnea (Pepsin y Candia, 1982; Domenech *et al.*, 1991). En las vías urinarias, se ha propuesto que la colina presente en la orina protege a la bacteria del desbalance osmótico generado por el cloruro de sodio y otros electrolitos (Rennick, 1981; Chambers y Kunin, 1987).

Resulta interesante que la virulencia de *P. aeruginosa* se haya relacionada con su capacidad de adaptarse al estrés osmótico (Shortridge *et al.*, 1992) y con la expresión de la fosfolipasa C (Ostroff *et al.*, 1990), enzima que se induce por la presencia de fosforilcolina, de colina o de glicina betaína en el medio (Lucchesi *et al.*, 1989; Ostroff *et al.*, 1990). También se ha encontrado que la acetilcolina y la colina producen un aumento en la actividad de la fosfatasa ácida de fosforilcolina, de la acetilcolinesterasa y de la BADH (Domenech *et al.*, 1991; Shortridge *et al.*, 1992; Lisa *et al.*, 1994; Nagasawa *et al.*, 1976). Por otra parte, experimentos realizados con cepas mutantes de *P. aeruginosa* deficientes en el gen que codifica para la BADH demostraron que el agente inductor de la fosfolipasa C es la glicina betaína o algún producto de su degradación (Sage *et al.*, 1997). Estos hallazgos sugieren que bajo las condiciones de infección la bacteria requiere de la actividad de la BADH para sobrevivir y colonizar los tejidos que infecta. Sage *et al.* también observaron que la mutante de *P. aeruginosa* deficiente en la actividad de BADH no es capaz de crecer ni en colina ni

en colina más glicina betaína, debido al efecto tóxico de la betaína aldehído que se acumula en la mutante cuando la colina está presente. Por tanto, la inhibición de la enzima BADH podría tener un doble efecto deletéreo sobre la bacteria si ésta está creciendo a expensas de colina o precursores de colina, ya que por un lado el crecimiento se detendría al impedirse la obtención de carbono, nitrógeno y energía y, por otro, la bacteria acumularía un compuesto sumamente tóxico, como la betaína aldehído.

La actividad de la BADH parece ser crucial para el crecimiento de la bacteria bajo las condiciones de infección, es decir, bajo estrés osmótico aunado a una abundancia de colina o de sus precursores. Por lo tanto, parece ser un blanco adecuado para agentes antimicrobianos que pudieran usarse como fármacos. Sin embargo, el desarrollo racional de agentes antimicrobianos específicos contra esta enzima requiere de un conocimiento de ella lo más completo posible.

II.1.2. Regulación de la expresión génica y de la actividad de BADH

La BADH no es una enzima alostérica y no se conocen metabolitos reguladores de su actividad, aparte de sus sustratos y de las coenzimas reducidas que son sus productos. El producto ácido de la reacción, la glicina betaína, es un inhibidor muy pobre (Velasco-García *et al.*, 2000; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). Su actividad parece ser, por tanto, regulada principalmente a través de la modulación de la expresión génica.

En diversas plantas se ha observado una expresión basal del transcrito que se induce bajo condiciones de estrés osmótico, provocado éste por déficit hídrico o por alta concentración de sales (Weretilnyk y Hanson, 1989; Weretilnyk y Hanson, 1990; McCue y Hanson, 1992; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Ishitani *et al.*, 1995; Wood *et al.*, 1996; Legaria *et al.*, 1998).

En *E. coli*, la biosíntesis de glicina betaína está controlada por los genes *betA* y *betB* que codifican para la colina deshidrogenasa y para la BADH, respectivamente (Lamark *et al.*, 1991). La expresión de los genes *bet* está controlada por la fuerza osmótica del ambiente y en forma menos importante por la disponibilidad de colina (Landfald y Strom, 1986; Styrvold *et al.*, 1986; Eshoo, 1988).

El producto de la reacción de la BADH, la glicina betaína, actúa únicamente como una sustancia osmoprotectora, ya que no es metabolizada ni por *E. coli* ni por las plantas acumuladoras de este compuesto (Le Rudulier *et al.*, 1984; Landfald y Strom, 1986; Rhodes y Hanson, 1993).

En contraste con *E. coli*, *S. meliloti*, *X. translucens* y *P. aeruginosa* pueden utilizar tanto colina como glicina betaína como fuente de carbono, nitrógeno y energía. En estas bacterias se han observado niveles basales muy bajos de la actividad de BADH cuando crecen en glucosa u otros compuestos y estos niveles se incrementan bajo condiciones de estrés osmótico o presencia de colina. La presencia de ésta o sus precursores estimula su rápida oxidación a glicina betaína y la degradación subsecuente de glicina betaína a través de una serie de desmetilaciones en *S. meliloti* (Bernard *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1988). En este mismo organismo, un incremento en la presión osmótica en el medio reduce el catabolismo de glicina betaína y favorece su acumulación (Bernard *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1988).

II.1.3. Estructura primaria

Todas las BADHs poseen un número de aminoácidos muy similar, en un intervalo de 486 a 511. La BADH de *P. aeruginosa* tiene 490 aminoácidos y su secuencia se presenta en la Figura 4.

Hasta el momento se conoce la secuencia de aminoácidos de las siguientes BADHs (32): *P. aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *E. coli*, *Yersinia pestis*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *S. meliloti*, *B. subtilis*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Streptomyces coelicolor*, *Thermoplasma volcanium*, *Beta vulgaris*, *Atriplex hortensis*, *Atriplex centralasiatica*, *Atriplex prostata*, *Spinacia oleracea*, *Suaeda liaotungensis*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Avicennia marina*, *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor*, *Caenorhabditis elegans*, *Gadus callarias* y *Homo sapiens*.

```

      10           20           30           40           50           60
      |           |           |           |           |           |
MARFEEQKLY IGGRYVEASS GATFETINPA NGEVLAKVQR ASREDVERAV QSAVEGQKVV
      *           *
      70           80           90           100          110          120
      |           |           |           |           |           |
AAMTAMQRSR ILRRAVDILR ERNDELAAL E TLDTGKPLAE TRSVDIVTGA DVLEYYAGLV
      * *
      130          140          150          160          170          180
      |           |           |           |           |           |
PAIEGEQIPL RETSFVYTRR EPLGVVAGIG Awnypvqial WKSAPALAAG NAMIFKPSEV
      *           * * * * * * * * * *
      190          200          210          220          230          240
      |           |           |           |           |           |
TPLTALKLAE IYTEAGVPDG VFNVLTSGR EVGQWLTEHP LIEKISFTGG TSTGKKVMAS
      * * * * * * *
      250          260          270          280          290          300
      |           |           |           |           |           |
ASSSSLKEVT MELGGKSPLI IFPDADLDRA ADIAVMANFF SSGVCTNGT RVFIHRSQQA
      * * * * * * * * * *
      310          320          330          340          350          360
      |           |           |           |           |           |
RFEAKVLERV QRIRLGDPQD ENTNFGPLVS FPHMESVLGY IESGKAQKAR LLCGERVTD
      370          380          390          400          410          420
      |           |           |           |           |           |
GAFGKGAYVA PTVFTDCRDD MTIVREEIFG PVMSILVYDD EDEAIRRAND TEYGLAAGVV
      *           * * * * * * *
      430          440          450          460          470          480
      |           |           |           |           |           |
TQDLARAHRA IHRLEAGICW INTWGESP AE MPVGGYKQSG VGRENLTTL AHYTRIKSVQ
      *           *           *
      490
      |
VELGDYASVF

```

Figura 4. Secuencia de aminoácidos de la BADH de *P. aeruginosa* (Stover *et al.*, 2000). Los residuos conservados en todas las BADHs se encuentran marcados con asteriscos, los residuos conservados en todas las ALDHs se encuentran en azul y las cisteínas en rojo.

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la BADH de *P. aeruginosa* con las secuencias de las BADHs que se conocen hasta la fecha nos muestra que aquella con la que tiene una mayor identidad es con la de la bacteria *P. putida*, del 82.9%, mientras que aquella con la que presenta una menor identidad, 36.0%, es con la de la levadura *S. pombe*. La secuencia de BADH de *P. aeruginosa* presenta una identidad relativamente alta, del



50.8%, con la de hígado de bacalao (*G. callarias*), que es la única BADH de la que se conoce su estructura tridimensional (Johansson *et al.*, 1998).

Existen 40 residuos conservados entre las BADHs (marcados con un asterisco en la secuencia de aminoácidos de la BADH de *P. aeruginosa* mostrada en la Figura 4). Entre estos residuos de aminoácidos que participan en la reacción catalizada se encuentran el Glu252, la Cys286 y la Asn153 (numeración de *P. aeruginosa*) que son residuos conservados en todas las ALDHs. La cisteína funciona como el nucleófilo del sitio activo, el glutámico como la base general que realiza la desprotonación de una molécula de agua para la hidrólisis del intermediario tioéster y la asparagina estabiliza al intermediario tiohemiacetal tetrahédrico (Abriola *et al.*, 1990; Farrés *et al.*, 1995; Wang y Weiner, 1995; Marchal *et al.*, 2001; Cobessi *et al.*, 2000; Ahvazi *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2001).

De los residuos conservados que son importantes para la unión de los sustratos se encuentran la Lys176 y el Glu386, que están involucrados en la unión al anillo de la ribosa del NAD⁺ (Sheikh *et al.*, 1997; Ni y Weiner 1997), y la Gly229, que es la primera glicina, perteneciente a la región conservada GXXXXG de las aldehído deshidrogenasas, importante también para la unión de la coenzima (Vedadi *et al.*, 1997; Hempel *et al.*, 1993). Hasta la fecha no se conocen residuos conservados que sean importantes para la estabilidad de ninguna de las ALDHs.

II.1.4. Estructura terciaria y cuaternaria

Las BADHs de diferentes orígenes presentan varios estados de agregación, pero siempre como homodímeros u homotetrámeros. Las BADHs de animales estudiadas hasta la fecha son tetrámicas (Chern y Pietruszko, 1995; Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998; Johansson *et al.*, 1998), las de plantas diméricas (Pan *et al.*, 1981; Arakawa *et al.*, 1987; Weretilnyk y Hanson, 1989; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994) y las de bacterias son tetrámicas (Mori *et al.*, 1980; Falkenberg y Strom, 1990; Mori *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 2002; Valenzuela-Soto *et al.*, 2003), excepto la de *B. subtilis* que es dimérica (Boch *et al.*, 1997).

A la fecha se conocen las estructuras tridimensionales de las siguientes ALDHs: la ALDH2 de bovino (Steinmetz *et al.*, 1997), la ALDH3 de rata (Liu *et al.*, 1997), la ALDH citosólica

de hígado de oveja (Moore *et al.*, 1998), la de *Streptococcus mutans* (Cobessi *et al.*, 1999), la retinal deshidrogenasa tipo II (Lamb y Newcomer, 1999), la de *Vibrio harveyi* (Ahvazi *et al.*, 2000) y la BADH de hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998).

La estructura de la BADH de hígado de bacalao es similar a las de las otras ALDHs conocidas. Estas enzimas poseen tres dominios distintos en cada subunidad: un dominio de unión a la coenzima que tiene una estructura α/β con un plegamiento de tipo Rossmann, un dominio catalítico que une al sustrato aldehído, el cual tiene un plegamiento similar al de la parte central del dominio de unión a la coenzima y un dominio de oligomerización que puede ser considerado como una extensión del dominio de unión a la coenzima (Fig. 5).

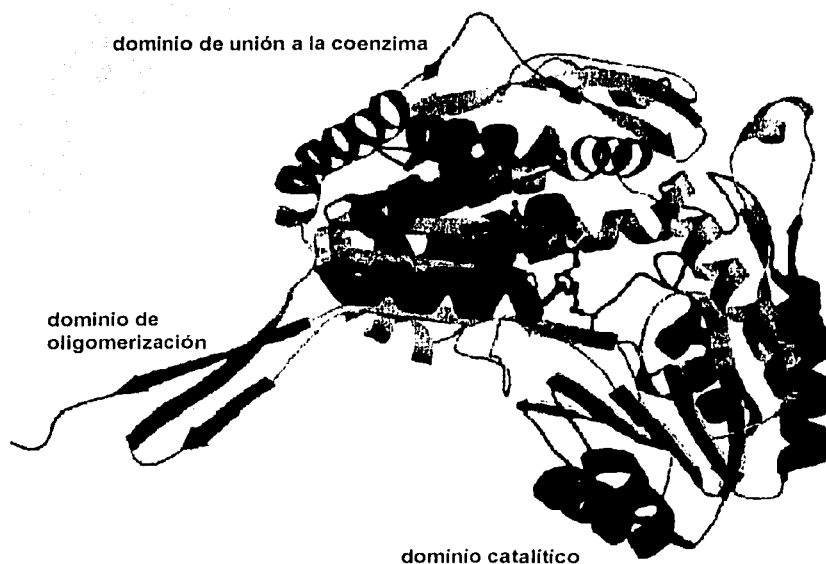


Figura 5. Organización de los dominios de un monómero de la BADH de hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998).

Las subunidades se asocian en dímeros de manera que las últimas hebras del dominio de oligomerización están formando puentes de hidrógeno con las últimas hebras del dominio catalítico de la segunda subunidad. El tetrámero está formado por dos dímeros que

interactúan a través de la región posterior del dominio donde se une la coenzima. Ambos dominios de oligomerización del dímero forman puentes de hidrógeno con la parte correspondiente del otro dímero (Johansson *et al.*, 1998).

II.1.5. Estabilidad

Se han realizado muy pocos estudios sobre la estabilidad de las ALDHs. Recientemente, se han llevado a cabo estudios de estabilidad térmica y frente a agentes desnaturalizantes químicos (urea) en la ALDH mitocondrial de humano clase 1 (ALDH1), enzima tetramérica, y en la ALDH de estómago humano clase 3 (ALDH3), enzima dimérica (Rodríguez-Zavala y Weiner, 2001; Rodríguez-Zavala y Weiner, 2002). La ALDH de *Cytophaga sp.*, enzima dimérica, es más estable a la temperatura que las anteriores (Yamanaka *et al.*, 2002).

En nuestro grupo de trabajo, se han realizado experimentos para estudiar el efecto de la temperatura, la dilución y la composición del amortiguador sobre la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*. En éstos se encontró que la incubación de la enzima a 40 °C produce una inactivación parcial, hasta un 60%, que puede ser revertida completamente si la enzima se enfría a 30 °C o a una temperatura menor. La enzima se inactiva por dilución a 0.3 µg/ml a pH 8.0, que es el pH óptimo para la actividad, pero se mantiene estable a esta concentración a pH 6.5 (Velasco-García *et al.*, 1999). También se ha encontrado que la BADH de *P. aeruginosa* es altamente inestable en amortiguadores que carecen del ion K⁺ (Velasco-García *et al.*, 1999; Valenzuela-Soto *et al.*, 2003). Las BADH de *P. aeruginosa* y de riñón de cerdo se disocian respectivamente en monómeros y dímeros inactivos a bajas fuerzas iónicas, mientras que ambas enzimas son tetraméricas a fuerzas iónicas cercanas a las fisiológicas. Sin embargo, la BADH de *P. aeruginosa* es inactiva aun como tetramero a menos que existan iones K⁺ en el medio. Estos resultados demuestran que la enzima BADH de *P. aeruginosa* tiene un requerimiento estricto por los iones K⁺ para mantener su conformación activa (Valenzuela-Soto *et al.*, 2003). Hasta la fecha no se sabe de ninguna otra BADH con este requerimiento. Si bien, se ha reportado que la enzima de *E. coli*

(Falkenberg y Strom, 1990), de hojas de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), de cangrejo (Dragolovich y Pierce, 1994), de *B. subtilis* (Boch, *et al.*, 1997) y de riñón de cerdo (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998) son activadas por K^+ , no se ha encontrado que este ión sea necesario para mantener su conformación activa. En lo que se refiere a las ALDHs, sólo se ha reportado que la ALDH mitocondrial de *Saccharomyces cerevisiae* requiere de iones K^+ para su actividad (Dickinson y Hywood, 1987) y que la ALDH mitocondrial de hígado de caballo puede disociarse en un par de dímeros en la presencia de iones Mg^{2+} (Takahashi y Weiner, 1980).

II.1.6. Propiedades cinéticas

II.1.6.1. Especificidad por los sustratos

Las BADHs pueden utilizar NAD^+ o $NADP^+$ como coenzimas, aunque existen diferencias entre las enzimas de diferentes orígenes en la preferencia por la coenzima. La mayoría de las enzimas estudiadas utilizan preferentemente al NAD^+ , como la de *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980), de espinaca (Weretilnyk y Hanson, 1989), de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990), de cangrejo (Dragolovich y Pierce, 1994), de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2001), de humano (Chern y Pietruszko, 1995), de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1996), de riñón de cerdo (Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto, 1998). Sólo las BADHs de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976; Velasco-García *et al.*, 1999, 2000), de *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992) y de *A. globiformis* (Mori *et al.*, 2002) usan indistintamente al NAD^+ o al $NADP^+$. La doble especificidad que tiene la BADH de *P. aeruginosa* por los nucleótidos es consistente con su papel anfibólico ya mencionado, ya que puede servir en el anabolismo o catabolismo dependiendo de la coenzima que utilice, ya sea $NADP^+$ o NAD^+ .

El grado de especificidad por el sustrato aldehído también es diferente entre las BADHs de diferentes orígenes. Las enzimas de hígado de humano (Kurys *et al.*, 1989; Ambroziak y Pietruszko, 1991) y de rata (Chern y Pietruszko, 1999) pueden catalizar la oxidación de varios ω -aminoaldehídos y otros aldehídos alifáticos. Otras enzimas como la de amaranto

(Vojtechová *et al.*, 1997) y la de remolacha (Trossat *et al.*, 1997) además de la betaína aldehído pueden utilizar el 3-aminopropionaldehído, el 3-dimetilsulfoniopropionaldehído y el 4-aminopropionaldehído. La enzima de plantas de amaranto silvestres puede catalizar la oxidación de gliceraldehído, gliceraldehído 3 fosfato y semialdehído succínico, aunque con una actividad menor al 2.5% con respecto a la que se obtiene con betaína aldehído (Figuroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2001). Sin embargo, otras BADHs son altamente específicas para la betaína aldehído, como es el caso de la de *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 1999), de la de la mitocondria del músculo cardiaco del cangrejo (Dragolovich y Pierce, 1994), de la de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990), de la de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1997) y de la de *A. globiformis* (Mori *et al.*, 2002).

II.1.6.2. Mecanismo cinético

Todas las BADHs estudiadas hasta la fecha presentan una cinética de saturación hiperbólica por el aldehído y la coenzima. El mecanismo cinético sólo se ha estudiado en las enzimas de *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980), de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990), de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993), de *B. subtilis* (Boch *et al.*, 1997), de riñón de cerdo (Figuroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000) y de *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.*, 2000). Se ha propuesto que las enzimas de *C. didymum*, de *E. coli* y de *B. subtilis* siguen un mecanismo cinético de tipo ping-pong, aunque este mecanismo no es consistente con la química de las aldehído deshidrogenasas y contrasta con el mecanismo secuencial que se ha descrito en las aldehído deshidrogenasas (Bradbury y Jakoby, 1971; Rivett y Tipton, 1981; Ryzewski y Pietruszko, 1980). Las BADHs de hoja de amaranto y de riñón de cerdo tienen un mecanismo cinético de tipo Iso Bi Bi ordenado en estado estacionario en el que el nucleótido oxidado es el primer sustrato en unirse a la enzima y el nucleótido reducido es el último producto en liberarse de la enzima. Para el caso de la enzima de *P. aeruginosa*, el mecanismo cinético es de tipo Bi Bi al azar, aunque la ruta preferente es la que involucra la unión del nucleótido oxidado antes de la unión del aldehído (Fig. 6).

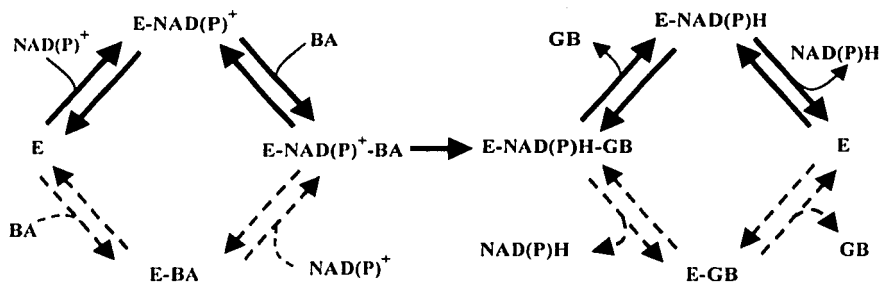


Figura 6. Mecanismo cinético propuesto para la BADH de *P. aeruginosa* de tipo Bi Bi al azar (Velasco-García *et al.*, 2000). La ruta preferente de adición de sustratos y de liberación de productos a bajas concentraciones de sustratos se muestra en líneas sólidas. BA, betaína aldehído; GB, glicina betaína.

En la Tabla II se incluyen los parámetros cinéticos de la BADH de *P. aeruginosa* en las reacciones dependientes de NADP^+ y de NAD^+ (Velasco-García *et al.*, 2000). A partir de los valores de la relación k_{cat}/K_m , podemos decir que la enzima BADH de *P. aeruginosa* es más eficiente en la reacción dependiente de NADP^+ ($1.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) que en la de NAD^+ ($3.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Los valores de la relación k_{cat}/K_m nos indican que esta enzima es bastante eficiente, aunque no ha alcanzado la perfección catalítica. En lo que se refiere a los valores de la relación k_{cat}/K_m para betaína aldehído son similares en las reacciones dependientes de NADP^+ y NAD^+ .

Tabla II. Parámetros cinéticos de la BADH de *P. aeruginosa*^a

Parámetros	Coenzima	
	NADP ⁺	NAD ⁺
k_{cat} (s ⁻¹)	261.0 ± 11.1	276.5 ± 14.2
K_i dinucleótido (μM)	47.7 ± 7.7	185.6 ± 35.1
K_m dinucleótido (μM)	83.4 ± 8.8	385.2 ± 42.7
K_i betaína aldehído (μM)	289.6 ± 55.7	209.2 ± 41.4
K_m betaína aldehído (μM)	506.8 ± 43.1	434.5 ± 44.5
k_{cat}/K_m dinucleótido (M ⁻¹ s ⁻¹)	1.6 × 10 ⁶	3.6 × 10 ⁵
k_{cat}/K_m betaína aldehído (M ⁻¹ s ⁻¹)	2.6 × 10 ⁵	3.1 × 10 ⁵

^aDatos tomados de Velasco-García *et al.*, 2000.

II.1.7. Mecanismo químico de la reacción catalizada

Remover un ión hidruro de un aldehído es energéticamente muy costoso debido al carácter dipolar del grupo carbonilo, por lo que la oxidación requiere de la conversión de un carbono planar a un carbono tetrahédrico (Fersht, 1999). Por esta razón, las aldehído deshidrogenasas usan una catálisis covalente con la formación de un intermediario tetrahédrico para oxidar el aldehído a un ácido. En todas las aldehído deshidrogenasas estudiadas hasta la fecha el nucleófilo para la catálisis es un residuo de cisteína (Hempel *et al.*, 1982, 1991, 1993; Von Bahr-Lindström *et al.*, 1985; Tu y Weiner, 1988 a/b; Kitson *et al.*, 1991; Blatter *et al.*, 1992; Wang y Weiner, 1995; Farrés *et al.*, 1995). El mecanismo de reacción propuesto, mostrado esquemáticamente en la Figura 7, involucra al grupo tiol de esta cisteína que realiza el ataque nucleofílico sobre el carbonilo del aldehído, formando

como intermediario covalente un tiohemiacetal (Hempel *et al.*, 1982, 1991, 1993; Von Bahr-Lindström *et al.*, 1985; Tu y Weiner, 1988 a/b; Kitson *et al.*, 1991; Blatter *et al.*, 1992; Wang y Weiner, 1995; Farrés *et al.*, 1995; Weiner *et al.*, 1995; Vedadi *et al.*, 1995).

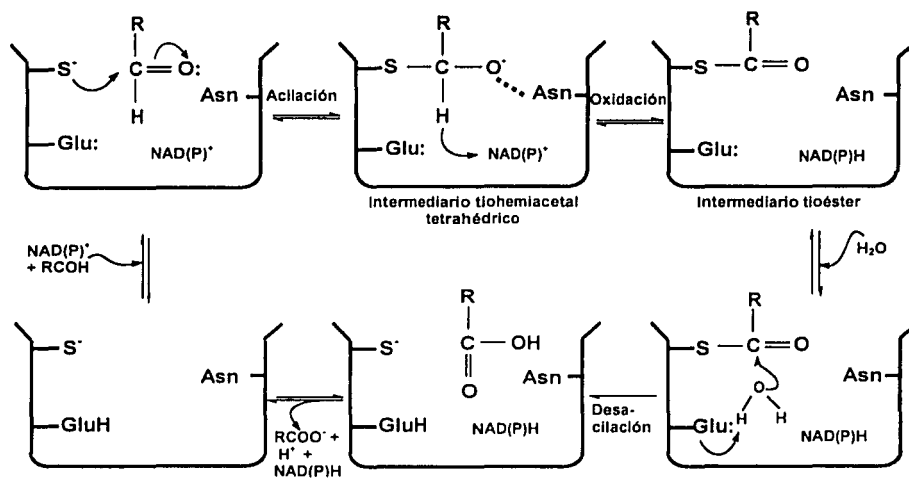


Figura 7. Esquema simplificado del mecanismo de reacción de las aldehído deshidrogenasas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La formación del intermediario tetrahédrico produce una distorsión conformacional que causa que el átomo de oxígeno del sustrato se mueva para ocupar el hoyo del oxianión del sitio activo, similar al que se encuentra en las serin-proteasas (Robertus *et al.*, 1972). En esta posición el oxianión forma un puente de hidrógeno con el grupo amida de la asparagina conservada, que ayuda así a la estabilización del oxianión, lo que permite una eficiente transferencia del hidruro hacia la posición C4 de la coenzima (Cobessi *et al.*, 2000; Ahvazi *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2001). Este intermediario covalente se oxida a tioéster cuando se lleva a cabo la transferencia del hidruro a la coenzima. Por otra parte, una base general, el glutámico conservado realiza la desprotonación de una molécula de agua, la cual ataca al tioéster liberando al ácido. Para la BADH se ha propuesto el mismo mecanismo de reacción (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993).

En todas las estructuras de ALDHs conocidas hasta la fecha el residuo de cisteína esencial para la catálisis se encuentra localizado en el fondo de un túnel que va desde la superficie de la molécula hacia este residuo (Steinmetz *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1998; Moore *et al.*, 1998; Cobessi *et al.*, 1999; Lamb y Newcomer, 1999; Ahvazi *et al.*, 2000). En un estudio reciente de mutagénesis sitio-dirigida con la BADH de *P. aeruginosa* se encontró que la Cys286 es el nucleófilo involucrado en la formación del tiohemiacetal (Velasco-García y Muñoz-Clares, datos no publicados).

En el modelo de la estructura tridimensional de la BADH de hígado de bacalao con el sustrato aldehído unido al sitio activo se observa que el oxígeno de este sustrato podría estar formando un puente de hidrógeno con la cadena lateral del residuo de asparagina conservada, la Asn166 (Johansson *et al.*, 1998).

II.1.7.1. Formas de activación de la cisteína catalítica

El grupo tiol del residuo de cisteína del sitio activo requiere de una activación inicial para que esté presente en la forma de tiolato (S^-), ya que ésta es la especie reactiva que funciona como nucleófilo. El pK_a del tiol de la cisteína libre es de 8.9, y, de ser éste el del residuo de la cisteína catalítica, las enzimas que utilizan un tiol como nucleófilo no serían activas a valores de pH fisiológicos. Esto implica que el ambiente del sitio activo esté diseñado de

manera que la cisteína catalítica sea accesible y que su pK_a esté considerablemente disminuido.

Existen diferentes mecanismos de activación química de un tiol del residuo de cisteína esencial, siendo uno de ellos la formación de un par iónico con un residuo de un aminoácido cargado positivamente (Polgár, 1973). La formación de estos pares iónicos provoca una disminución de varias unidades de pH en el pK_a del tiol, y por tanto a valores de pH fisiológicos la cisteína catalítica está mayoritariamente en forma de tiolato.

En la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa fosforilante de *E. coli*, de *Bacillus stearothermophilus* y de *Methanothermus fervidus* se ha encontrado que la forma de activación química del tiol de la cisteína esencial es a través de la formación de un par iónico con un aminoácido cargado positivamente (histidina en estos casos) (Talfournier *et al.*, 1998, 1999), tal y como fue encontrado anteriormente en otras enzimas que usan un residuo de cisteína como nucleófilo como la papaína y la proteinasa 2A de rinovirus (Polgár, 1973; Lewis *et al.*, 1976; Sárkány *et al.*, 2000).

En la familia de las tiorredoxinas se ha encontrado que la localización del residuo de cisteína nucleofílica en el extremo amino terminal de una alfa hélice disminuye el pK_a del tiol, ya que las cargas parciales positivas del dipolo-hélice estabilizan al tiolato (Kortemme y Creighton, 1995). Sin embargo, muy recientemente en los experimentos de mutagénesis sitio-dirigida que se han realizado en una proteína modelo para investigar el efecto dipolo-hélice sobre la ionización del tiolato se ha mostrado que la magnitud y la naturaleza de este efecto son dependientes de la posición en la hélice del residuo de cisteína. En este estudio se encontró que el efecto electrostático del dipolo de la hélice alfa no puede explicar el gran desplazamiento de pK_a de una cisteína catalítica, pero los puentes de hidrógeno que forma el tiol con la cadena principal sí pueden ser suficientes para causar una perturbación de la magnitud esperada en el pK_a de la cisteína (Miranda, 2003).

La estructura cristalográfica de la creatin cinasa de músculo sugiere que la formación de puentes de hidrógeno con el grupo hidroxilo de una serina podría ser la causa de la disminución del pK_a del tiol. Sin embargo, la mutagénesis sitio-dirigida de esta serina, demostró que este puente de hidrógeno no es capaz de producir un efecto significativo

sobre el pK_a de la cisteína, por lo que al menos en este caso deben existir otros factores que contribuyan al grado de ionización del tiol (Wang *et al.*, 2001).

Otro mecanismo de activación es a través de la utilización de un grupo carboxilo de un residuo de glutámico que toma el protón del tiol convirtiéndolo en tiolato (Wang y Weiner, 1995). De hecho, se ha propuesto que en la aldehído deshidrogenasa mitocondrial de hígado de humano el residuo de glutámico conservado (Glu252 en la secuencia de la BADH de *P. aeruginosa*), está activando a la cisteína esencial y a la molécula de agua involucrada en el paso de desacilación (Wang y Weiner, 1995).

En la aldehído deshidrogenasa de *V. harveyi* se ha sugerido que la Asn169 que estabiliza al intermediario tetrahédrico tiohemiacetal, también puede estabilizar al tiolato en ausencia del sustrato, ya que existe una conformación alterna de la cisteína esencial que sitúa al azufre dentro de una distancia de un puente de hidrógeno con la amida de la cadena lateral de la asparagina (Ahvazi *et al.*, 2000).

II.2. PAPEL DE LAS CISTEÍNAS EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Las cisteínas son de los residuos de aminoácidos menos abundantes en las proteínas. La presencia de las cisteínas parece estar correlacionada positivamente con la complejidad de los organismos; su abundancia va desde 2.26 % del total de aminoácidos en promedio en las proteínas de los mamíferos al 0.5 % en las proteínas de especies del orden *Archeobacteria* (Miseta y Csutora, 2000).

La cisteína es un aminoácido que posee un grupo tiol muy reactivo, que no se ioniza a pH fisiológico y que forma puentes de hidrógeno relativamente débiles, por lo que no contribuye significativamente a la estabilidad de las proteínas por medio de enlaces salinos y su contribución por formación de puentes de hidrógeno no es, en términos generales, significativa. La frecuencia con la que una cisteína puede funcionar como un aceptor en un puente de hidrógeno es del 7%. Si bien es extraño que una cisteína forme puentes de hidrógeno, cuando éstos se forman usualmente las distancias son mayores a las distancias promedio de los puentes de hidrógeno O---H ó OH---O, debido al tamaño del átomo de

azufre. La distancia promedio al hidrógeno del donador es de 2.34 Å con un ángulo promedio de 122°. En cuanto a la fuerza relativa de la interacción, los átomos involucrados en la formación de puentes de hidrógeno pueden ser N, O, F, Cl y ocasionalmente los átomos de S.

Las cisteínas contribuyen significativamente a la estabilidad de las proteínas extracelulares, mediante la formación de puentes disulfuro. Éstos estabilizan la estructura nativa de la proteína haciéndola menos susceptible a la degradación por proteasas y disminuyendo el número de las posibles conformaciones desplegadas características del estado desnaturalizado, lo que al disminuir la entropía conformacional de este estado lo hace energéticamente más difícil de alcanzar. Puesto que el ambiente en el interior de las células bajo condiciones normales es altamente reductor, las proteínas intracelulares no usan puentes disulfuro para estabilizar su estructura nativa. Por el contrario, si éstos llegan a formarse bajo una condición de estrés oxidativo, generalmente se altera la estructura nativa de tal forma que conlleva la pérdida de la función de la proteína. Sin embargo, existe un importante mecanismo de regulación de numerosos procesos celulares que se basa en la modificación reversible por oxidación-reducción específica de residuos de cisteína de proteínas involucradas en la catálisis, la expresión génica, la transducción de señales, el plegamiento (chaperonas), etc. Estas modificaciones incluyen la formación y ruptura de puentes disulfuro, -ya sea de la misma proteína o de disulfuros mixtos con otro tiol como el del glutatión-, la formación de ácido sulfénico, o la S-nitrosilación. Actualmente, este mecanismo de regulación por modificación covalente reversible se considera equiparable, en cuanto a su relevancia en el control biológico, a aquellos que implican otras modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, la glicosilación o la metilación. Por tanto, en el ambiente intracelular los residuos de cisteína de las proteínas juegan un papel funcional más que estructural, participando en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad de enzimas o de otras proteínas involucradas en diversos procesos tales como el ciclo celular, la acción hormonal, la replicación del ADN, la transcripción, la meiosis, el desarrollo embrionario temprano, la reparación y el ensamble de proteínas, la germinación de semillas, etc.

El grupo tiol de la cadena lateral de las cisteínas es excelente para unir metales, - particularmente el zinc-, por lo que estos residuos forman parte de motivos estructurales conocidos como los dedos de zinc como del sitio activo de enzimas que usan este metal en su mecanismo catalítico (Schwabe y Klung, 1994). También los residuos de cisteína pueden participar en la unión de las agrupaciones hierro-azufre (Fe-S), que son cofactores de proteínas que juegan importantes papeles en el metabolismo, la transferencia de electrones y la regulación de la expresión génica (Gerber y Lill, 2002).

Como ya lo mencionamos anteriormente las cisteínas participan en la catálisis enzimática, ya que en el sitio activo de algunas enzimas se encuentra un residuo de cisteína altamente reactivo responsable de la catálisis nucleofílica, en la que el sustrato es modificado por la formación de un enlace covalente con la enzima para dar un intermediario reactivo.

Enzimas conocidas que usan el grupo tiol de un residuo de cisteína en catálisis nucleofílica son: 1) las aldehído deshidrogenasas (Weiner *et al.*, 1995), entre ellas la BADH objeto de este estudio, 2) las tiol proteasas como la papaína (Polgár, 1973) y la bromelaína (Maurer, 2001), que hidrolizan las proteínas y favorecen la digestión de las mismas; las caspasas, proteasas que juegan un papel fundamental en la apoptosis (Watt *et al.*, 1999), y las catepsinas, proteasas funcionales en la respuesta inmune; 3) las carbamil fosfato sintetetasas, que producen el carbamil fosfato utilizado en la síntesis de arginina y pirimidinas en los organismos superiores (Chaparian y Evans, 1991); 4) las peroxirredoxinas, enzimas que destruyen el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos reduciéndolos a agua o a su correspondiente alcohol, respectivamente, y que por tanto juegan un papel importante en la respuesta de las células a la estrés oxidativo (Kang *et al.*, 1998); 5) las proteína-tirosín fosfatasas, que están involucradas en los mecanismos de transducción de señales (Denu *et al.*, 1996); 6) las poliquétido sintetasas, que producen una serie de productos naturales que son usados como antibióticos, agentes anticancerígenos, etc. (Jez y Noel, 2000); y 7) las tiol:disulfuro oxidorreductasas, como las tiorredoxinas, glutarredoxina, la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR), la NADP⁺-tiorredoxina reductasa (NTR), la glutation reductasa (GR), que participan en la regulación de la actividad de muchas proteínas intracelulares manteniendo o recuperando el estado reducido de sus cisteínas (Kortemme y Creighton, 1995).

II.3. LA MODIFICACIÓN QUÍMICA Y LA MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA

La modificación química es uno de los métodos más usados para identificar a los grupos funcionales de una proteína. Por tanto, el éxito de la modificación química es llegar a producir un cambio en alguna propiedad de la enzima que pueda correlacionarse con el papel funcional de un residuo específico (Montero *et al.*, 2001). Este método requiere únicamente de reacciones químicas que sean específicas para cada tipo de aminoácido. Existen reactivos específicos para la modificación química de las cadenas laterales de algunos aminoácidos como los ácidos aspártico y glutámico, la histidina, la arginina, las lisinas, la metionina, el triptófano, la tirosina, la serina y la cisteína (Imoto y Yamada, 1989).

Los residuos de aminoácidos que participan en la actividad catalítica suelen ser accesibles al solvente y muy reactivos, lo que facilita su modificación. Cuando ésta se lleva a cabo en la presencia y en la ausencia de ligandos es un buen método para identificar a los residuos del sitio activo. Además, de este modo se puede medir la constante de disociación de los complejos de los ligandos con la enzima y detectar cambios conformacionales inducidos por éstos. También se puede llegar a obtener los valores de pK_a de los residuos estudiados y conocer el efecto de los ligandos sobre su estado de ionización. En el caso concreto de las cisteínas, la técnica de modificación química se ha usado para explorar la existencia de residuos de cisteínas vecinales. Por todo lo mencionado anteriormente, el uso de la modificación química de un residuo que participa en unión de los sustratos o en los pasos químicos de la reacción nos ayuda a conocer algunas características del ambiente que rodea al sitio activo.

Por su parte, la mutagénesis sitio-dirigida tiene la ventaja de alterar la estructura de la proteína de una forma mucho más específica que la modificación química, debido a que se cambian únicamente ciertos aminoácidos sin introducir grupos extraños a la proteína. En muchas ocasiones ambas técnicas son complementarias. La modificación química puede identificar y determinar la reactividad de los residuos que están involucrados en la unión de los sustratos o en los pasos químicos de la reacción y la mutagénesis sitio-dirigida puede ser usada para identificar a los residuos que están involucrados en la unión de los sustratos o

que forman parte de sitios catalíticos y analizar su función, así como para establecer el papel de las cadenas laterales de los aminoácidos en el plegamiento de las proteínas (Imoto y Yamada, 1989).

La modificación química y la mutagénesis sitio-dirigida son enfoques experimentales diferentes, que exploran aspectos complementarios de las propiedades de un sitio activo. Por este motivo su uso combinado y si es posible, apoyado con buenos datos cristalográficos, puede ser la forma más completa de encarar el estudio funcional de una enzima (Montero *et al.*, 2001).

II.3.1. Modificación química de cisteínas

Los residuos de cisteína pueden oxidarse fácilmente alcanzando diferentes estados de oxidación como son el ácido sulfénico (-SOH), el ácido sulfinico (-SO₂H), el ácido sulfónico o cisteico (-SO₃H) y el puente disulfuro (-S-S-). La oxidación a ácido sulfénico y la que conlleva la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína es reversible por agentes reductores, mientras que los otros dos estados de oxidación, ácidos sulfinico y sulfónico, no pueden ser reducidos a cisteína (Kice, 1980) (Fig. 8). El ácido sulfénico es muy inestable y, si no se encuentra en un ambiente apropiado que lo proteja de la oxidación posterior, fácilmente se oxida irreversiblemente a sulfinico o sulfónico, o forma un puente disulfuro si está cercano a otro tiol (Kice, 1980).

Los grupos tioles de estos residuos poseen un alto grado de reactividad y esta propiedad ha permitido su modificación química a través de diferentes reactivos específicos y altamente selectivos que reaccionan rápidamente. Dado que el grupo tiol es el nucleófilo más fuerte de los grupos funcionales de los aminoácidos, la especificidad de muchos reactivos para los grupos tioles es generalmente alta. El número de los reactivos específicos para monotioles es muy grande y están diseñados de acuerdo a algunas de las reacciones que los grupos tioles pueden llevar a cabo como la alquilación y la formación de un disulfuro mixto. Entre los reactivos que producen alquilación de forma irreversible se encuentran la *N*-etilmaleimida (NEM) (Lundbland, 1995), el iodoacetato y la iodoacetamida (Lundbland,

1995) (Fig. 9) y entre los que producen la formación de un disulfuro mixto el ácido metilmetanotiosulfonato (MMTS) (Smith *et al.*, 1975), el ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) (Ellman, 1959) y el disulfiram (Vallari y Pietruszko, 1982) (Fig. 10).

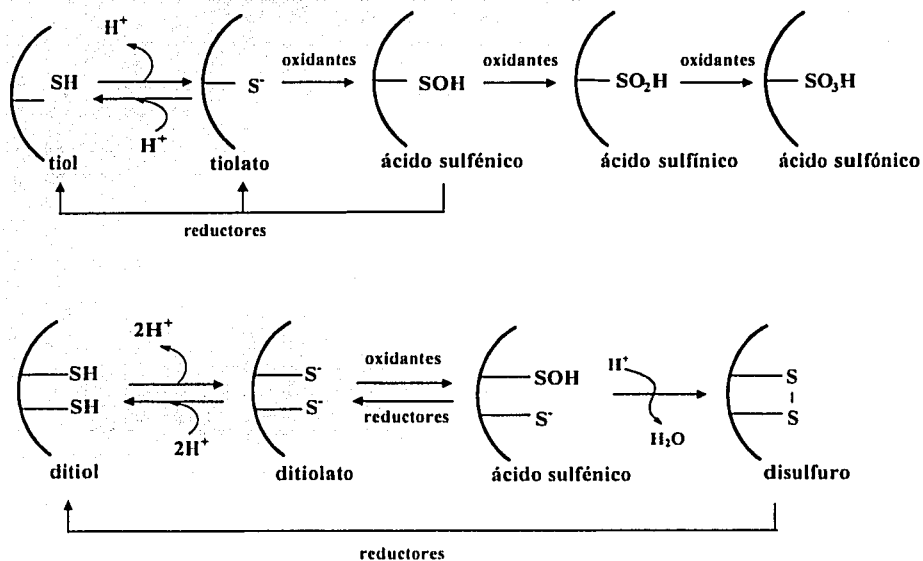
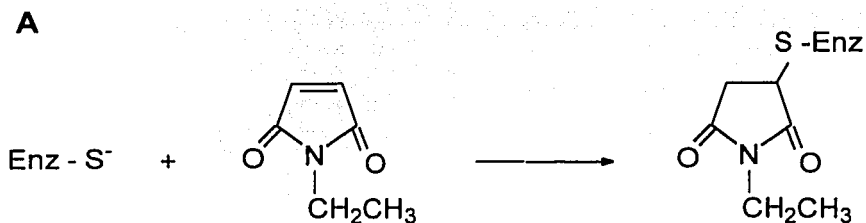


Figura 8. Estados de oxidación de las cisteínas

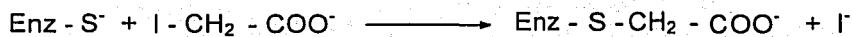
El MMTS es un reactivo muy interesante porque actúa rápidamente y específicamente con grupos monotioles introduciendo un grupo pequeño (-SCH₃) dentro de la proteína. Su efecto puede ser revertido por ditiotretiol (DTT) o β-mercaptoetanol (Smith *et al.*, 1975).

El DTNB es uno de los reactivos más utilizados para determinar el número de grupos tioles de una proteína. Es un disulfuro aromático que reacciona con tioles alifáticos haciendo un

intercambio para formar un disulfuro mixto con la proteína produciendo un mol de 2-nitro, 5-tiobenzoato por mol de grupo sulfhidrilo de proteína (Fig. 10). El anión 2-nitro, 5-tiobenzoato tiene un intenso color amarillo con una absorbancia molar de $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 412 nm (Ellman, 1959; Habeeb, 1972).



B



C



Figura 9. Esquema de reacción de la NEM (A), del ácido iodoacético (B) y de la iodoacetamida (C) con residuos de cisteína

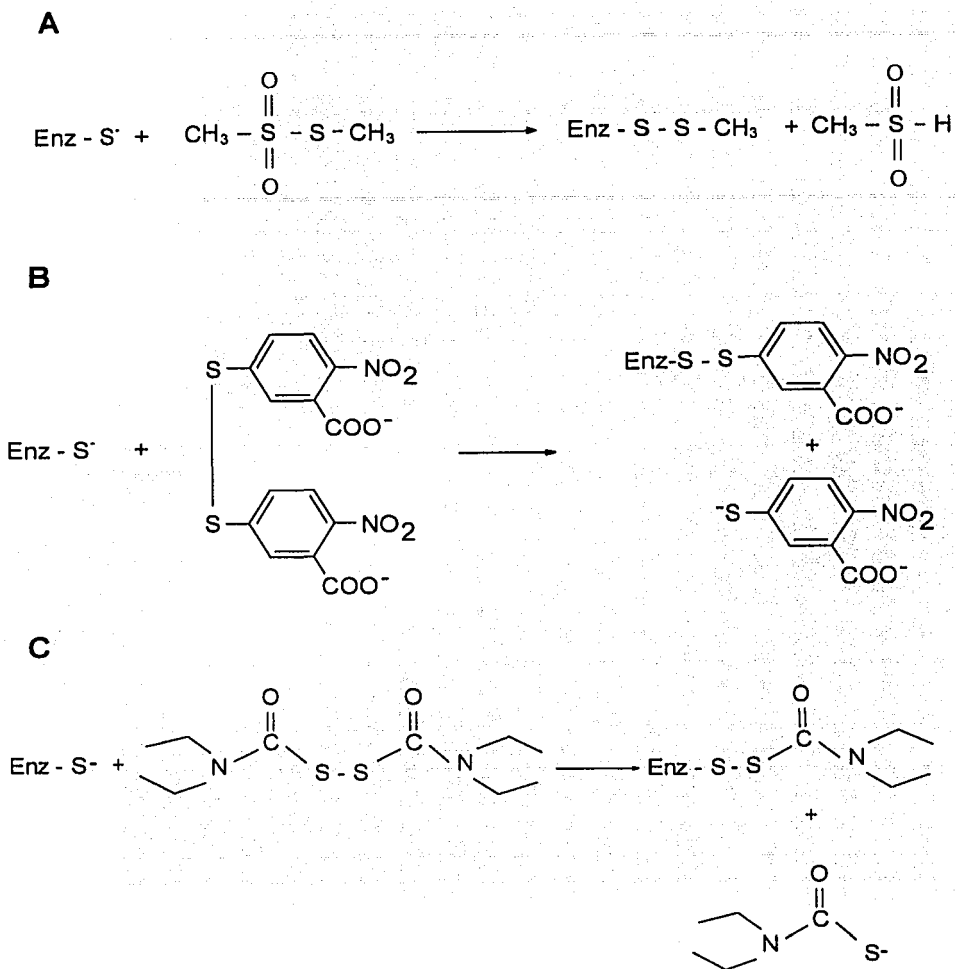


Figura 10. Esquema de reacción del MMTS (A), del DTNB (B) y del disulfiram (C) con residuos de cisteína

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Existen además reactivos que se han usado para ditioles, es decir, para grupos tiol cercanos con capacidad de formar puentes disulfuro, como el As-BAL (Fluharty y Sanadi, 1961), el complejo cobre-(o-fenantrolina)₂ (Cu(OP)₂) (Kobasi, 1968) y la diamida (Kosower, 1969). El arsenito forma derivados ditioarsenicales cíclicos con compuestos que posean grupos tioles vecinales, como el 2, 3-dimercaptopropanol (BAL) o el DTT. Debido a su estabilización por la formación de un anillo, estos derivados poseen constantes de estabilidad mucho mayores que los derivados monoarsenicales que pueden formarse con compuestos que poseen sólo un tiol (Stocken, 1947).

En el caso del As-BAL, el modelo propuesto para explicar su mecanismo de acción postula que el complejo As-BAL neutraliza la carga del arsenito permitiendo así que éste tenga acceso a sitios muy hidrofóbicos, como pueden ser sitios activos de las enzimas (Fluharty y Sanadi, 1961). Una vez allí, si encuentra una pareja de sulfhidrilos vecinales en la geometría adecuada para formar un complejo ditioarsenito más estable que el formado con el BAL, el arsenito es cedido por el As-BAL a la enzima, de acuerdo a la Figura 11.

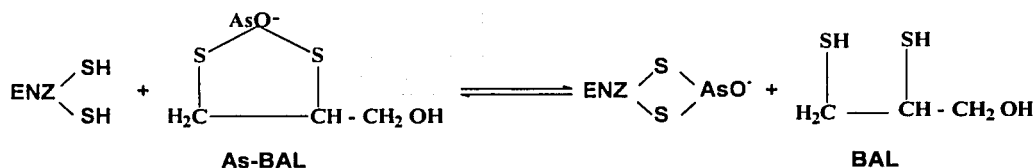


Figura 11. Esquema de reacción del As-BAL con un par de cisteínas vecinales (Fluharty y Sanadi, 1961)

II.3.2. Modificación química de las cisteínas de las aldehído deshidrogenasas

Debido a la importancia que tienen las cisteínas en las aldehído deshidrogenasas se ha realizado la modificación química de estos residuos en enzimas de esta familia como la de

hígado humano (Hempel y Pietruszko, 1981; Hempel *et al.*, 1982), de hígado de caballo (Tu y Weiner, 1988 a/b), de hígado de oveja (Hill *et al.*, 1994), del alga verde *Clamydomonas reinhardtii* (Iglesias *et al.*, 1987) y de hoja de espinaca (Iglesias y Losada, 1988). Estudios similares se han realizados con las BADHs de *P. aeruginosa* (Nagasawa *et al.*, 1976), de *C. didymum* (Mori *et al.*, 1980), de *E. coli* (Falkenberg y Strom, 1990), de *X. translucens* (Mori *et al.*, 1992) y de hoja de amaranto (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). En la mayoría de los casos el residuo modificado ha sido la cisteína esencial, en ciertos estudios la inactivación total de estas enzimas producida por reactivos específicos para ditioles ha sugerido la presencia en el sitio activo de estas enzimas de residuos de cisteína vecinales al de la cisteína esencial (Jakoby, 1968; Iglesias *et al.*, 1987; Iglesias y Losada, 1988).

Debido a su interés en el tratamiento del alcoholismo (Hald *et al.*, 1948; Graham, 1951), se ha estudiado a fondo la modificación irreversible de la forma mitocondrial de la ALDH hepática (ALDH2) por el disulfiram. Este compuesto forma puentes disulfuro mixtos con los grupos sulfhidrilos esenciales de la proteína, como se mostró en la Figura 10, (Vallari y Pietruszko, 1982), o provoca la formación de un disulfuro intrasubunidad (Lipsky, 2001).

La inhibición de la ALDH2 produce una elevación de acetaldehído después de una ingestión de alcohol, lo que a su vez produce náuseas, vómito, taquicardia e hipotensión, por lo que este fármaco se ha utilizado clínicamente desde hace 50 años como tratamiento del alcoholismo (Kitson, 1977; Myhre *et al.*, 2001; Lipsky *et al.*, 2001). *In vivo*, se piensa que los metabolitos del disulfiram, como el *S*-metil *N, N*-dietilditiocarbamato (MeDTC) sulfóxido y la sulfona, son los agentes inactivantes de la aldehído deshidrogenasa mitocondrial (MacKerell *et al.*, 1985; Mays *et al.*, 1995; Lam *et al.*, 1997) y/o citosólica de hígado de humano (Lam *et al.*, 1997). *In vitro*, estos compuestos son potentes inactivadores de estas enzimas.

Otro fármaco cuyo blanco pueden ser las ALDHs es el dinitrato de isosorbide. Este compuesto se usa clínicamente como un relajante del músculo liso en el tratamiento de angina de pecho y, al igual que el disulfiram, en el tratamiento del alcoholismo. El mecanismo de acción del dinitrato de isosorbide involucra la formación de un enlace covalente con la cisteína nucleofílica de algunas ALDHs (Fig. 12) (Mukerjee y Pietruszko, 1994).

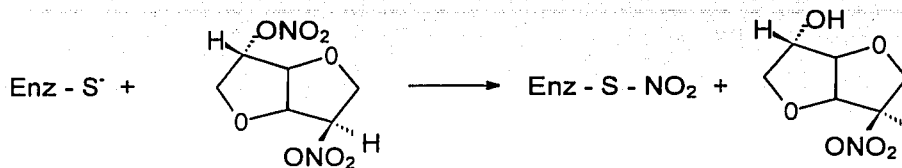


Figura 12. Esquema de reacción del dinitrato de isosorbide con residuos de cisteína

Los primeros trabajos de modificación química realizados con la BADH de *P. aeruginosa* mostraron que diferentes reactivos para sulfhidrilos como el *p*-(cloromercuro)benzoato, el ácido iodoacético y el acetato de mercurio producen una pérdida apreciable de la actividad de la enzima, lo que sugirió la existencia de cisteínas esenciales (Nagasawa *et al.*, 1976). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se comprobó que el disulfiram inactiva totalmente a las BADHs de *P. aeruginosa* y de *A. hypochondriacus* y que la unión del NAD(P)⁺ a la enzima aumenta esta inactivación (Velasco-García *et al.*, 2003).

A pesar de su interés, se han realizado muy pocos estudios acerca de la reactividad del tiol de la cisteína esencial de las ALDHs en general y de los factores que puedan modular esta reactividad. Los únicos estudios de este tipo se han llevado cabo recientemente sobre la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa fosforilante (Talfournier *et al.*, 1998; Talfournier *et al.*, 1999) y no fosforilante (Marchal y Branlant, 1999) de diferentes organismos. Hasta la fecha no se han realizado con ninguna BADH, por lo que consideramos que sería muy interesante realizar este estudio, con el fin de incrementar nuestro conocimiento sobre el funcionamiento de esta importante enzima, que, como mencionamos, puede ser un blanco para el desarrollo de fármacos contra *P. aeruginosa*.

Como un primer paso para caracterizar a las cisteínas de la BADH de *P. aeruginosa*, en mi trabajo de tesis de maestría realizamos la modificación química de estos residuos con reactivos específicos para monotioles y ditioles. La inactivación de la enzima con los reactivos para monotioles y la protección que ofrecen los sustratos frente a esta inactivación

sugerían la existencia de una cisteína esencial para la actividad de la BADH de *P. aeruginosa*. El tratamiento de la enzima con reactivos para ditioles como el As-BAL, producía una inactivación reversible, lo que indicaba la existencia de una pareja de cisteínas vecinales. Una de estas cisteínas parecía ser la esencial, puesto que los sustratos protegían totalmente frente a esta inactivación. Por otra parte, los resultados de modificación química en presencia de alguno de los sustratos parecían indicar que bajo estas condiciones una cisteína no esencial se modificaba en forma simultánea a la esencial y que esta cisteína al ser modificada evitaba la posterior modificación de la cisteína esencial (González-Segura, 1999).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

P. aeruginosa está expuesta a una gran variedad de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno que incluyen superóxidos, radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno, peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos. Todos estos productos son generados por el metabolismo aeróbico de las bacterias y como intermediarios de las reacciones de respuesta de defensa del hospedero. Tener un tiol altamente reactivo, como se requiere para que la catálisis nucleofílica por un residuo de cisteína tenga lugar a valores de pH fisiológicos, bajo estas condiciones aerobias sería un gran riesgo para la enzima BADH, ya que estaría expuesta continuamente a la oxidación. Por esto, pensamos que esta enzima deberá tener algún mecanismo que le permita regular la reactividad del residuo de cisteína catalítico. Conocer este mecanismo es de interés tanto teórico como práctico.

Por otra parte, la enzima BADH tiene otras tres cisteínas y alguna de éstas podría tener una función importante, ya sea en la regulación de la actividad, como parecían sugerir los resultados obtenidos en mi trabajo de tesis de maestría, o en la estabilidad de la enzima.

IV. HIPÓTESIS

Como se menciona anteriormente, la *P. aeruginosa* está expuesta a una gran variedad de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, por lo que la BADH deberá tener algún mecanismo que le permita regular la reactividad del residuo de cisteína catalítico, confiriéndole protección contra una posible oxidación sin comprometer su eficiencia catalítica. Una posible forma de modular la reactividad de la cisteína esencial de esta enzima podría ser mediante cambios conformacionales inducidos por los ligandos.

Por otra parte, las cisteínas no esenciales de esta enzima podrían estar involucradas en alguna función reguladora de su actividad y/o en su estabilidad.

V. OBJETIVOS

V. 1. OBJETIVO GENERAL

Investigar el papel que juegan las cisteínas en la actividad y/o estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa* mediante la modificación química y la mutagénesis sitio-dirigida.

V. 2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el pK_a de la cisteína catalítica midiendo su reactividad frente a un reactivo específico a diferentes valores de pH y en ausencia y presencia del $NADP^+$.
2. Investigar el efecto que puedan tener los ligandos sobre la reactividad de la cisteína esencial.
3. Investigar el papel de las cisteínas no esenciales en la actividad y/o en la estabilidad de la BADH. Para ello, en las enzimas mutadas en estas cisteínas por mutagénesis sitio-dirigida se estudiarán:
 - a) Sus propiedades cinéticas, determinando K_m para los sustratos y k_{cat} .
 - b) La reactividad de su cisteína catalítica.
 - c) Sus propiedades estructurales, investigando posibles cambios en estructura secundaria, terciaria y cuaternaria.
 - d) Su estabilidad bajo diferentes condiciones (altas temperaturas, dilución, bajas concentraciones de K^+ y agentes desnaturizantes como la urea).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos que se emplearon en este trabajo se describen en los artículos I, II y III. La técnica empleada para la modificación de las cisteínas por As-BAL, no contenida en esos artículos, se describe a continuación.

VI.1. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LAS ENZIMAS BADH SILVESTRE Y MUTANTES DE *P. aeruginosa* POR As-BAL

Las enzimas puras, BADH silvestre y mutantes (20-30 $\mu\text{g/mL}$), se incubaron con As-BAL 250 μM en un amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7.5, que contiene β -mercaptoetanol 5 mM, sacarosa 10% (p/v), EDTA 0.05 mM y KCl 125 mM. Se tomaron alícuotas de 5 μL a diferentes intervalos de tiempo y se determinó en ellas la actividad enzimática remanente. La solución de As-BAL se preparó inmediatamente antes de su uso, mezclando soluciones equimolares de As y BAL en agua destilada en una proporción 1:1 (Bagui *et al.*, 1996). Los datos experimentales de inactivación se analizaron utilizando un programa de regresión no lineal y la ecuación de decaimiento exponencial sencillo parcial (ecuación 1):

$$E_t/E_0 = e^{-kt} + E_\infty/E_0 \quad (1)$$

en donde E_t , E_0 y E_∞ son la actividad de la enzima BADH al tiempo t , al tiempo cero, y al tiempo de equilibrio (tiempo ∞), respectivamente, y k es la constante de velocidad de inactivación de pseudo-primer orden.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tesis se encuentra dividida en dos partes, la primera se refiere al estudio de la reactividad de la cisteína esencial y la segunda al estudio del papel de las cisteínas no esenciales en la actividad y estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*.

VII. 1. REACTIVIDAD DE LA CISTEÍNA ESENCIAL DE LA BADH DE *P. aeruginosa*

Los experimentos de modificación química realizados durante la maestría nos mostraron la existencia de una cisteína esencial para la actividad de la BADH de *P. aeruginosa* localizada en el sitio activo. El alineamiento de la secuencia de la BADH con las secuencias de otras aldehído deshidrogenasas indicó que la Cys286 es la única cisteína conservada y, por tanto, es el nucleófilo involucrado en la formación del tiohemiacetal con el sustrato aldehído, lo que se confirmó en un estudio reciente de mutagénesis sitio-dirigida (Velasco-García y Muñoz-Clares, datos no publicados). Con el fin de estudiar la reactividad de esta cisteína catalítica y los factores que pueden modularla, modificamos a la enzima químicamente con el MMTS, un reactivo que reacciona rápida y específicamente con grupos tioles introduciendo un grupo pequeño dentro de la proteína (-SCH₃).

Los resultados obtenidos se presentan en dos artículos. En el primero de ellos, titulado "Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*" y publicado en la revista *Biochemical Journal*, se agrupan los resultados del estudio de modificación química de la cisteína esencial usando MMTS y la modulación de su reactividad por la unión de los nucleótidos oxidados y reducidos.

La S-metilación del grupo tiol de las cisteínas con MMTS ha sido bien caracterizada en numerosas enzimas, comprobándose que la especie reactiva hacia el MMTS es el ión tiolato (Lewis *et al.*, 1976; Roberts *et al.*, 1986). Se ha encontrado lo mismo para la reacción con otros reactivos específicos del grupo tiol, como la N-etilmaleimida (NEM) (Bednar, 1990) y la iodoacetamida (Talfournier *et al.*, 1998; Marchal y Branlant, 1999), y para las reacciones con especies reactivas de oxígeno como el radical superóxido (Barret *et al.*, 1999) y el

peróxido de hidrógeno (Poole y Claiborne, 1989; Denu y Tanner, 1998; Griffiths *et al.*, 2002). Por ello, la reactividad de los grupos tioles de las proteínas está determinada, además de por su accesibilidad al disolvente, por la fracción del tiol que esté presente en la forma de tiolato y por la reactividad intrínseca de este tiolato. Los dos últimos factores dependen de la basicidad del grupo tiol, es decir de su pK_a , debido a que éste define el grado de ionización y la reactividad intrínseca del grupo tiol a cualquier valor de pH (Fersht, 1999).

Como esperábamos, se encontró que la cisteína es muy reactiva en un intervalo de pH de 5.5 - 9.0. La dependencia del pH de la constante de velocidad de inactivación de segundo orden de BADH por MMTS sugiere que a valores considerablemente inferiores a pH 7.0 la cisteína esencial existe como tiolato, lo cual posiblemente pueda deberse a la formación de un par iónico con un residuo cargado positivamente. Suponiendo que éste es el caso, ajustamos nuestros datos experimentales a la ecuación derivada del mecanismo que se muestra en la figura 13 y estimamos los valores de pK_a macroscópicos tanto del tiolato presente en la especie que contiene el tiolato formando el par iónico como de aquella en la que no lo forma. El valor de pK_a estimado para el tiolato libre fue de 8.6, mientras que para el tiolato que forma el par iónico fue de 4.0. Este último valor se encuentra en el intervalo de 3.3 - 4.0 que se ha encontrado para el tiolato del sitio activo de las tiol proteasas (Lewis *et al.*, 1976; Roberts *et al.*, 1986; Polgár y Csoma, 1987).

La desprotonación del residuo cargado positivamente, que hipotéticamente forma el par iónico con el tiolato, aumenta la reactividad de éste, incrementando su pK_a y/o su exposición al solvente. La formación de pares iónicos provoca así una disminución de varias unidades de pH en el pK_a del tiol y, por lo tanto, a los valores de pH del medio intracelular el residuo de cisteína catalítica está mayoritariamente en forma de tiolato.

El mecanismo de activación química de un tiol de la cisteína esencial a través de la formación de un par iónico con un residuo cargado positivamente (histidina generalmente) que estabiliza al ión tiolato se ha encontrado en diferentes enzimas, como la papaína (Polgár, 1974; Lewis *et al.*, 1976; Roberts *et al.*, 1986), la subtilisina (Polgár y Halasz, 1973), la glutatión transferasa de placenta humana (Lo Bello *et al.*, 1993), la arsenato reductasa (Gladysheva *et al.*, 1996), la chalcona sintasa (Jez y Noel, 2000), la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa no fosforilante (Marchal y Branlant, 1999) y

fosforilante (Polgár, 1973; Soukri *et al.*, 1989; Talfournier *et al.*, 1998). Todas estas enzimas requieren de una cisteína altamente reactiva para llevar a cabo la catálisis nucleofílica. En la Tabla IV se muestran los valores de pK_a y de reactividad de algunas enzimas que se conoce forman un par iónico, o se supone que lo hacen, como el caso de la BADH de *P. aeruginosa*.

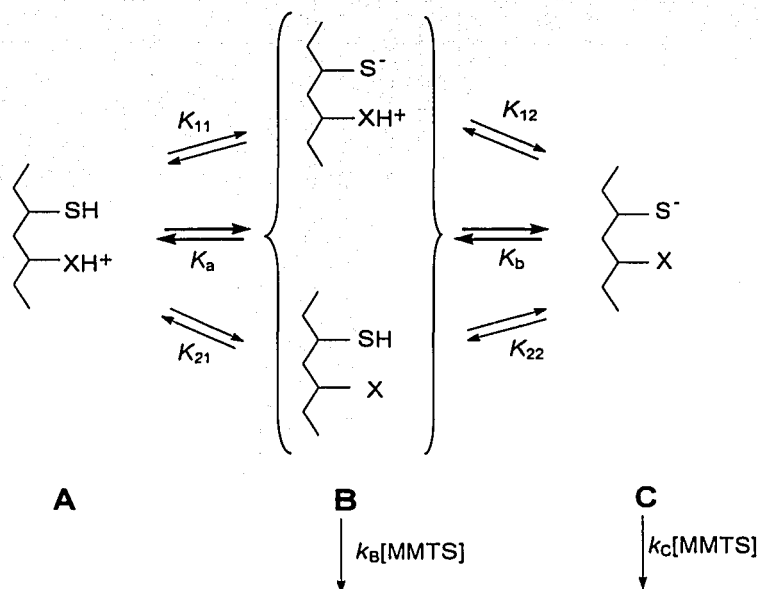


Figura 13. Mecanismo de ionización de un grupo tiol de un residuo de cisteína formando un par iónico. K_{11} y K_{22} son las constantes microscópicas de disociación del protón del grupo tiol. K_{21} y K_{12} son las constantes microscópicas de disociación del protón del grupo cargado positivamente. K_a y K_b son las constantes macroscópicas de disociación del protón de las especies A y B, respectivamente, y k_B y k_C son las constantes de segundo orden de la reacción del tiolato en las especies B y C con MMTS, respectivamente (González-Segura *et al.*, 2002)

Tabla IV. Constantes de velocidad de segundo orden para la reacción de los residuos de cisteínas catalíticas con los reactivos específicos y valores de pK macroscópicos de sus grupos tiol

Enzima	Reactivo	k_B ($M^{-1} s^{-1}$)	pK_a	k_C ($M^{-1} s^{-1}$)	pK_b
GraP-DH de <i>E. coli</i> ⁽¹⁾					
	Iodoacetamida				
Apoenzima		2.7	4.45	38.5	8.87
Holoenzima		12	5.75	234	8.35
GraP-DH no fosforilante de <i>S. mutans</i> ⁽²⁾					
	Iodoacetamida				
Holoenzima		64	6.78	164	7.53
Glutation transferasa de placenta humana ⁽³⁾					
	Bromopiruvato	20	3.9	1.3×10^4	9.2
Proteinasa del Rinovirus 2A ⁽⁴⁾					
	Iodoacetamida	2.1	7.06	19.5	9.16
	Iodoacetato	0.5	5.68	3.1	8.93
Papaína ⁽⁵⁾	MMTS	2.1×10^5	4.0	5.1×10^5	8.6
BADH de <i>P. aeruginosa</i> ⁽⁶⁾					
Apoenzima	MMTS	5×10^2	4.0	3.9×10^4	8.66
Holoenzima		5×10^3	4.0	1.4×10^4	7.44

De acuerdo a la Figura 13. k_B y k_C son los valores de las constantes de inactivación del tiolato en las especies B y C. pK_a y pK_b son los valores de pK macroscópicos del tiolato en las especies B y C. GraP-DH, D-gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa; 2PDS, 2,2'-dipiridil disulfuro. Estos valores fueron tomados de ⁽¹⁾ Talfournier *et al.*, 1998; ⁽²⁾ Marchal y Branlant, 1999; ⁽³⁾ Lo Bello *et al.*, 1993; ⁽⁴⁾ Sárkány *et al.*, 2000; ⁽⁵⁾ Roberts *et al.*, 1986 y ⁽⁶⁾ González-Segura *et al.*, 2002.

Como se puede observar en esta tabla, los valores de pK_a son muy parecidos entre todas ellas para las dos especies de tiolatos. Sin embargo, en los valores de las constantes de inactivación de segundo orden sí existen diferencias. Por ejemplo, los valores de las constantes de segundo orden de la reacción del tiolato formando el par iónico (k_B) y del tiolato libre (k_C) de la BADH con el reactivo modificador son de casi tres órdenes de magnitud y de un orden de magnitud, respectivamente, menores que los valores correspondientes observados con la papaina. Además, la comparación de nuestros datos de reactividad de la cisteína esencial con el MMTS cuando está formando el par iónico y cuando está en forma de tiolato libre, con el valor que se obtiene a partir de la ecuación de Brønsted nos indica que la reactividad de la cisteína esencial es baja. Esto posiblemente se deba a que la cisteína no está completamente accesible al solvente, es decir, que exista una inhibición estérica de la reacción producida por la estructura de la proteína.

Los resultados del ajuste de nuestros datos a la ecuación derivada del modelo de un par iónico con dos grupos ionizables, indicaban que podría estar involucrado un tercer grupo que disminuía la reactividad del tiolato, de acuerdo con la Figura 14. Esto también se ha planteado en otras enzimas como la papaina (Roberts *et al.*, 1986) y la chalcona isomerasa (Bednar, 1990).

Hasta la fecha no hemos identificado a los residuos de aminoácidos que pudieran estar afectando la reactividad de la cisteína esencial. Sin embargo, con la ayuda del modelo tridimensional de nuestra enzima, realizado en este trabajo de tesis con la colaboración del Dr. Enrique Rudiño Piñera del Instituto de Biotecnología de la UNAM, basándonos en las coordenadas cristalográficas de la única BADH cuya estructura tridimensional se conoce, que es la de hígado de bacalao, pensamos que los posibles candidatos son la Lys96 y la His333, aunque en el modelo se encuentran a una distancia de 10 y 13 Å de la cisteína esencial, que es demasiado lejos para formar un par iónico. Para poder concluir a este respecto nos falta tener las distancias reales, las cuales se podrán conocer cuando se obtenga la estructura tridimensional de nuestra enzima a partir de cristalografía y difracción de rayos X. Aun cuando se encontraran a una distancia de la cisteína esencial no adecuada para formar un par iónico, pudieran tener efectos sobre la ionización del grupo tiol, porque, como se ha propuesto en el caso de la ribonucleasa seminal (Parente *et al.*, 1985) y de la

α 1-antitripsina, el efecto electrostático de las cargas positivas en el ambiente que rodea a la cisteína esencial de estas enzimas es la base de su ionización y de su reactividad (Griffiths *et al.*, 2002).

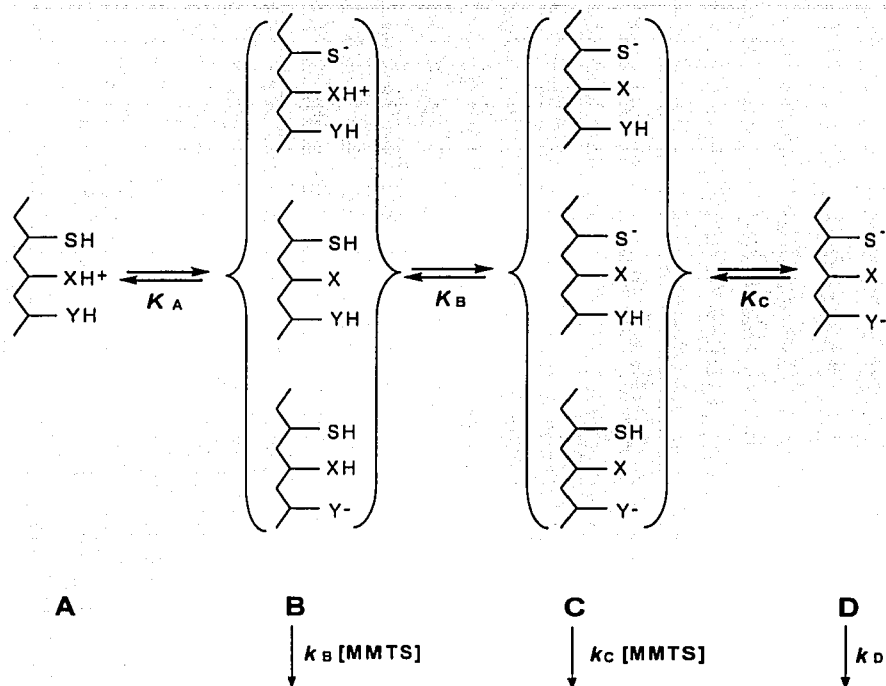


Figura 14. Mecanismo propuesto para la ionización de un grupo tiol de un residuo de cisteína esencial de la BADH de *P. aeruginosa*. K_A , K_B y K_C son las constantes de disociación macroscópicas de las especies A, B y C, respectivamente. k_B , k_C y k_D son las constantes de segundo orden de la reacción del tiolato en las especies B, C y D con MMTS, respectivamente (González-Segura *et al.*, 2002). La especie C es menos reactiva que las especies B y D.

α 1-antitripsina, el efecto electrostático de las cargas positivas en el ambiente que rodea a la cisteína esencial de estas enzimas es la base de su ionización y de su reactividad (Griffiths *et al.*, 2002).

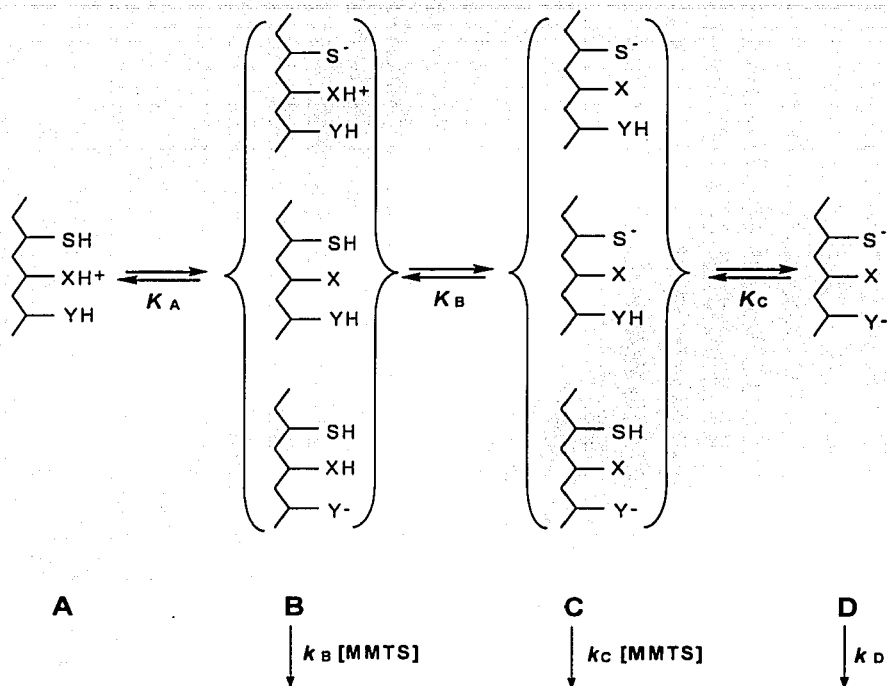


Figura 14. Mecanismo propuesto para la ionización de un grupo tiol de un residuo de cisteína esencial de la BADH de *P. aeruginosa*. K_A , K_B y K_C son las constantes de disociación macroscópicas de las especies A, B y C, respectivamente. k_B , k_C y k_D son las constantes de segundo orden de la reacción del tiolato en las especies B, C y D con MMTS, respectivamente (González-Segura *et al.*, 2002). La especie C es menos reactiva que las especies B y D.

En otras enzimas se han encontrado interacciones diferentes capaces de activar al grupo tiol como se ha descrito en la sección de antecedentes de esta tesis.

En el modelo tridimensional de la BADH de *P. aeruginosa*, al igual que en la estructura cristalográfica de la BADH de hígado de bacalao, la cisteína esencial, Cys286, se encuentra localizada en un asa, por lo que descartamos que su activación se deba al efecto del dipolo de la hélice alfa. La Cys286 se encuentra en el fondo de un túnel que va desde la superficie de la molécula hacia este residuo. Existe la posibilidad de que el Glu252, que es la base general que se ha propuesto que participa en la activación de la molécula de agua en el paso de desacilación, pueda estar activando al tiol tomando su protón y convirtiéndolo en tiolato. De hecho esto se ha propuesto para la aldehído deshidrogenasa mitocondrial de hígado de humano (Wang y Weiner, 1995). Sin embargo, esta posibilidad aún no ha sido probada en nuestra enzima, por lo que sería conveniente realizar una mutante de este Glu252 para determinar la reactividad de la cisteína esencial en ausencia de este residuo.

VII.2. MODULACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE LA CISTEÍNA ESENCIAL POR LOS LIGANDOS

Para determinar el pK_a del grupo tiol de la cisteína esencial en el complejo binario enzima-dinucleótido, investigamos la dependencia del pH de la constante de velocidad de inactivación de segundo orden de BADH por MMTS a concentraciones saturantes (6 mM) de $NAD(P)^+$ y $NAD(P)H$. Encontramos que la incubación de la enzima con MMTS en la presencia de los dinucleótidos resultó en una pérdida de actividad que sigue una cinética bifásica: una primera fase rápida con una alta reactividad del tiolato seguida de una segunda fase con menos reactividad del tiolato.

La existencia de una inactivación bifásica en presencia del $NADP^+$ nos sugería que la unión de los nucleótidos reducidos u oxidados podrían producir un cambio conformacional relativamente lento que hiciera al tiolato menos accesible al solvente. Para probar esta posibilidad, se inició la reacción de la enzima con MMTS después de diferentes periodos de preincubación con $NAD(P)^+$ o $NAD(P)H$.

En la Figura 15 se presentan los resultados del efecto del NAD(P)^+ y NAD(P)H sobre la inactivación de la BADH por MMTS, ya que en el Artículo I sólo se muestran los resultados obtenidos con NADH.

Las cinéticas de inactivación de la BADH por MMTS en presencia de NAD(P)^+ y NAD(P)H son muy similares: a medida que aumenta el tiempo de preincubación con el dinucleótido, la amplitud de la primera fase de inactivación disminuye, mientras que las constantes de velocidad de inactivación de pseudo-primer orden permanecen sin ningún cambio. El NAD^+ y el NADH producen un efecto muy parecido sobre las cinéticas de inactivación de la BADH por MMTS, como se observa en las Figuras 15A y B. Cuando se realizan las cinéticas de inactivación por MMTS en presencia del NADP y del NADPH se observa que el efecto de estos dos dinucleótidos es muy similar (Figuras 15C y D). En los insertos mostramos el cambio con respecto al tiempo de preincubación en la amplitud de la primera fase, es decir de la proporción de actividad enzimática perdida en la primera fase de inactivación. Estos datos se ajustaron a una ecuación de un doble decaimiento exponencial, considerando que al tiempo cero de preincubación teníamos el 100% de holoenzima en la conformación E' , que es la enzima con el tiolato de alta reactividad y conforme va aumentando el tiempo de preincubación va disminuyendo la conformación E' y va apareciendo la conformación E'' , que es la enzima con el tiolato de baja reactividad. De esta forma se obtuvieron las constantes de velocidad para el cambio de E' a E'' que se muestran en la Tabla 3 del Artículo I junto con los resultados de la reactividad del tiolato en estas formas de la enzima.

En un estudio realizado con la enzima gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa no fosforilante de *Streptococcus mutans* se reportaron cambios de reactividad del tiolato esencial inducidos por dinucleótidos (Marchal y Branlant, 1999). Sin embargo, estos hallazgos son diferentes a los nuestros, ya que ellos encuentran una disminución rápida inicial en la reactividad del tiolato producida por la unión del dinucleótido, seguida de un lento aumento en la reactividad.

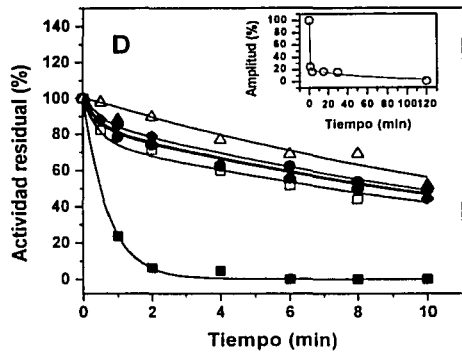
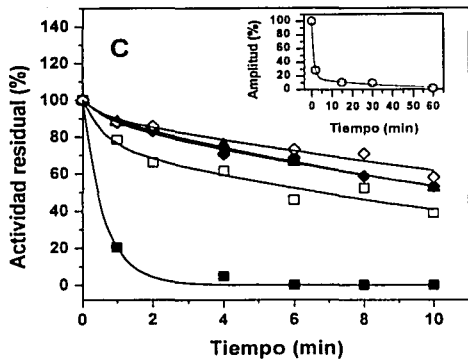
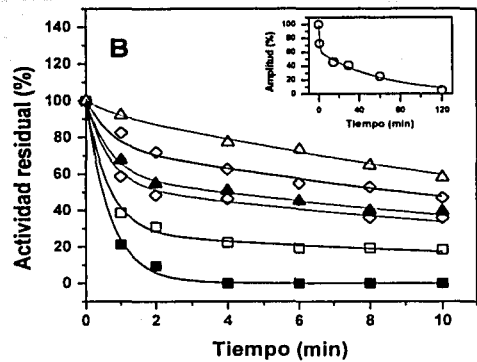
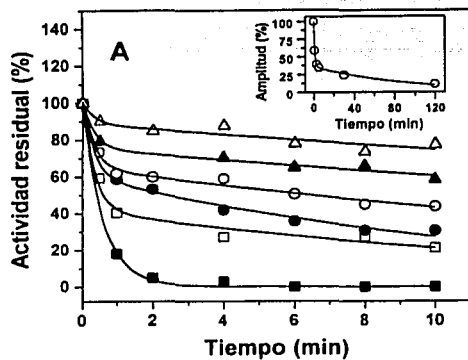


Figura 15. Efecto de los dinucleótidos sobre la inactivación de BADH por MMTS. La enzima ($0.5 \mu\text{M}$) se incubó con $5 \mu\text{M}$ de MMTS en ausencia (■) o en presencia de 6 mM de NAD^+ (A), NADH (B), NADP^+ (C) y NADPH (D), los cuales fueron agregados a la enzima a 1 (□), 3 (●), 5 (○), 15 (◆), 30 (▲), 60 (◇) y 120 (Δ) min antes del tratamiento con MMTS. El amortiguador usado fue MES/HEPES/CHES 30 mM , pH 8.0, con EDTA 1 mM , KCl 25 mM y trehalosa 600 mM . Los datos obtenidos en ausencia del dinucleótido fueron ajustados a la ecuación de un decaimiento exponencial sencillo y los obtenidos en presencia del dinucleótido a la de un doble decaimiento exponencial. En los insertos se observa el regráfico de las amplitudes de la primera fase de inactivación contra el tiempo.

RECIBIDO CON
FOLIA DE ORIGEN

Se estudió además el efecto del NADP^+ sobre la reactividad de la cisteína catalítica en un intervalo de pH de 5.5 a 9.0 y se encontró que en presencia de concentraciones saturantes de NADP^+ la reactividad del tiolato se encuentra aumentada significativamente en los valores de pH menores a 8.5, en comparación con lo que se obtuvo en ausencia del dinucleótido (Figura 3 del Artículo I). La constante de velocidad de inactivación de segundo orden del tiolato en el par iónico es 10 veces mayor en la holoenzima que en la apoenzima. Por otra parte, la unión del NADP^+ elimina el efecto del tercer residuo que afectaba la reactividad de la cisteína esencial y el pK_a del tiolato libre, que en este caso es de 7.44, que es más de una unidad de pH por debajo del valor de pK_a del grupo tiol de una cisteína libre.

Estos resultados proveen evidencia de una activación conformacional de la cisteína esencial después de que se une el dinucleótido, sugiriendo que a valores de pH por debajo de 8.5 esta unión dispara un rearrreglo del sitio activo hacia una conformación más abierta, lo cual probablemente lleva a que el tiol se vuelva más accesible al solvente y por lo tanto tenga una mayor reactividad.

El perfil de la dependencia del pH del cociente entre la constante de velocidad de inactivación de segundo orden en presencia y ausencia de NADP^+ permitió encontrar un grupo ionizable de un residuo de aminoácido con un pK_a 7.16, cuya protonación está relacionada con el cambio rápido de reactividad de la Cys286 por la unión del dinucleótido. Este resultado sugiere que el rearrreglo rápido del sitio activo inducido por el dinucleótido, el cual proponemos que resulta en una conformación más abierta, requiere que cierto grupo se protone.

En nuestro laboratorio se ha encontrado recientemente que la presencia de los nucleótidos oxidados aumenta la velocidad de inactivación de la BADH de *P. aeruginosa* por disulfiram, cuando los ligandos y el reactivo modificador se agregan simultáneamente a la enzima (Velasco-García *et al.*, 2003). Esto concuerda con el aumento en reactividad del tiolato inducido por los dinucleótidos oxidados encontrados en este trabajo. Sin embargo, en contraste con los resultados de esta tesis, los dinucleótidos reducidos produjeron una disminución en la inactivación por disulfiram (Velasco-García *et al.*, 2003). Esta discrepancia podría deberse a las diferencias de tamaño entre los dos reactivos para tioles. Es posible que la unión del NADH y del NADPH, pero no la de NAD^+ y el NADP^+ ,

disminuya la accesibilidad del tiolato esencial al reactivo voluminoso, lo que produciría una protección frente a este reactivo a pesar de que tanto los nucleótidos oxidados como los reducidos aumenten la reactividad del tiolato, como encontramos con MMTS.

En resumen, nuestros resultados indican que la unión de los dinucleótidos tiene dos efectos sobre la reactividad del tiolato hacia el MMTS: 1) un incremento transitorio en su reactividad a pH por debajo de 8.5, resultado de un cambio conformacional muy rápido, y 2) una disminución en reactividad como resultado de un cambio conformacional lento.

La conformación del sitio activo de la apoenzima produce un tiol con baja reactividad, a pesar de que se encuentre en la forma del tiolato. Esta conformación "cerrada" probablemente proteja a la apoenzima de una inactivación por oxidación del tiolato catalítico por el oxígeno ambiental o por especies reactivas de oxígeno, ya que hemos encontrado que la BADH de *P. aeruginosa* permanece activa aún 24 h después de haberle quitado el reductor, el cual se utiliza para proteger a la enzima de oxidación por oxígeno ambiental. En contraste, la alta reactividad del grupo tiol de la cisteína esencial en la holoenzima podría ser perjudicial, porque puede incrementar el riesgo de oxidación de este grupo.

La unión de los dinucleótidos aumenta la reactividad de la cisteína esencial, probablemente, como ya se ha discutido, porque haya un aumento en la accesibilidad de su grupo tiol al solvente. Esto daría como resultado un aumento en la velocidad de formación del tiohemiacetal con el sustrato aldehído, por lo que el rápido cambio conformacional producido por la unión de los dinucleótidos probablemente produciría una holoenzima con más alta afinidad por la betaina aldehído que la apoenzima. El mecanismo cinético de la BADH de *P. aeruginosa* es consistente con esta propuesta, ya que el dinucleótido es el primer sustrato que se une preferentemente (Velasco-García *et al.*, 2000). Por el contrario, el cambio lento inducido por los dinucleótidos, que resulta en una conformación de enzima con un tiol esencial muy poco reactivo, se traduciría en una protección de la holoenzima contra la inactivación, efecto que podría ser relevante si las concentraciones de aldehído son bajas, y por tanto exista una elevada proporción de holoenzima libre. Nuestros resultados sugieren que la BADH de *P. aeruginosa* ha desarrollado un mecanismo complejo, que

involucra una serie de rearrreglos en el sitio activo, para ajustar la reactividad del tior
esencial de acuerdo con la disponibilidad de los dinucleótidos y del sustrato.

VII.2.1. Artículo I.

“Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*”

Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*

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

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México, and †Laboratorio de Osmorregulación, F.E.S. Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios, Tlalnepanliá, Estado de México, 54090, México

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) catalyses the irreversible NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine. In the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* this reaction is an obligatory step in the assimilation of carbon and nitrogen when bacteria are growing in choline or choline precursors. As with every aldehyde dehydrogenase studied so far, BADH possesses an essential cysteine residue involved in the formation of the intermediate thiohemiacetal with the aldehyde substrate. We report here that the chemical modification of this residue is conveniently measured by the loss in enzyme activity, which allowed us to explore its reactivity in a pH range around neutrality. The pH dependence of the observed second-order rate constant of BADH inactivation by methyl methanethiosulphonate (MMTS) suggests that at low pH values the essential cysteine residue exists as thiolate by the formation of an ion pair with a positively charged residue. The

estimated macroscopic pK values are 8.6 and 4.0 for the free and ion-pair-forming thiolate respectively. The reactivity towards MMTS of both thiolate forms is notably lower than that of model compounds of similar pK, suggesting a considerable steric inhibition by the structure of the protein. Binding of the dinucleotides rapidly induced a significant and transitory increment of thiolate reactivity, followed by a relatively slow change to an almost unreactive form. Thus it seems that to gain protection against oxidation without compromising catalytic efficiency, BADH from *P. aeruginosa* has evolved a complex and previously undescribed mechanism, involving several conformational rearrangements of the active site, to suit the reactivity of the essential thiol to the availability of coenzyme and substrate.

Key words: chemical modification, NAD(P)H-induced conformational changes, thiolate pK, thiolate reactivity.

INTRODUCTION

The human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is able to grow on choline as well as choline precursors as the sole carbon, nitrogen and energy source [1]. One obligatory step in the catabolism of these compounds is the irreversible NAD(P)⁺-dependent oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine, catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8). Glycine betaine is one of the most effective osmoprotectants in bacteria, algae, higher plants and animals [2,3]. *P. aeruginosa* is able to thrive under osmotic stress, particularly in the presence of the osmoprotectant glycine betaine or compounds which can produce glycine betaine, such as phosphatidylcholine, acetylcholine, phosphorylcholine or choline [4,5]. Because both osmotic stress [6] and these compounds [5,7–9] are present in the tissues infected by the bacteria, it is conceivable that BADH is a key enzyme in the establishment and growth of the pathogen. Given the high prevalence of antibiotic-resistant strains of *P. aeruginosa*, it is desirable to design new chemotherapeutic agents against this opportunistic pathogen. A rational approach should rely on the identification of aspects in the biochemistry of the bacteria that can be exploited. One such target might be the enzyme BADH.

Although the physicochemical and kinetic properties of BADH have been studied [10,11], little attention has been devoted to the study of the amino acid residues in the active centre of this enzyme and no data are available on its reaction mechanism. On the basis of its likely analogy with the mechanism of other

aldehyde dehydrogenases [12–14] it can be assumed that the first step in the BADH-catalysed reaction is the formation of a thiohemiacetal between an essential cysteine residue and the substrate betaine aldehyde. However, this proposal has not been tested experimentally. The primary sequence of BADH from *P. aeruginosa* has already been published as a result of the *Pseudomonas* Genome Project [15]. The BADH subunit has 490 residues and only four cysteine residues. Alignment of the *Pseudomonas* BADH sequence with all other known aldehyde dehydrogenase sequences [16] indicates that Cys²⁸⁶ is the only conserved cysteine residue and it is probably the nucleophile involved in the thiohemiacetal formation. A study of the site-directed mutant Cys²⁸⁶ → Ala confirmed this prediction (R. Velasco-García and R. A. Muñoz-Clares, unpublished work).

To understand the mechanistic aspects of the BADH reaction in *Pseudomonas*, we modified the enzyme chemically in an attempt to investigate the factors affecting the reactivity of the essential cysteine residue. The reactivity of a protein's thiol group is determined by several factors: (1) the fraction of the thiol that is present as the thiolate form; (2) the intrinsic reactivity of the thiolate, which is dependent on the basicity of this group; and (3) the accessibility of the thiolate group to the solvent. We therefore determined the pK of Cys²⁸⁶ because this defines the extent of ionization and the intrinsic reactivity of its thiol group at any given pH value. Chemical modification with methyl methanethiosulphonate (MMTS), a small reagent that reacts rapidly and specifically with thiol groups and introduces a small group (-SCH₃) into the protein [17], has been used. In addition, by

Abbreviations used: BADH, betaine aldehyde dehydrogenase; Ches, 2-(*N*-cyclohexylamino)ethanesulphonic acid; DTT, dithiothreitol; MMTS, methyl methanethiosulphonate; Nbs₂, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid).

† To whom correspondence should be addressed (e-mail clares@servidor.unam.mx).

comparing the observed reactivity of the essential thiol towards MMTS with that expected for model alkyl thiols of similar pK values, the accessibility of this group to the solvent can be inferred.

We report here that the essential Cys residue in the BADH molecule exists mostly as a thiolate ion in the pH range 4.5–9.0 as a result of the formation of an ion pair with a positively charged residue. The low reactivity of the apoenzyme thiolate suggests that this group is not fully exposed to the solvent. However, at pH 8.0 and below, its reactivity increases significantly on binding of the oxidized or reduced coenzymes. This increase is transitory because the reactivity progressively decreases to a fixed low value, most probably as a consequence of a relatively slow ligand-induced conformational rearrangement of the active site. The possible implications of this new complex mechanism of modulation of thiolate reactivity are discussed.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and biochemicals

Betaine aldehyde chloride, glycine betaine (inner salt), NAD(P)⁺, NAD(P)H, 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (Nbs₂), MMTS, dithiothreitol (DTT), Mes, Hepes, 2-(*N*-cyclohexylamino)ethanesulphonic acid (Ches) and trehalose were obtained from Sigma (St Louis, MO, U.S.A.). EDTA was from Merck KGAA (Darmstadt, Germany). All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Enzyme purification and assay

BADH was purified to homogeneity from *P. aeruginosa* PAO1 strain by the rapid purification procedure reported previously [10]. The purity of the enzyme was assessed by SDS/PAGE as described previously [10]. The enzyme does not contain bound NAD(P)⁺ or NAD(P)H as judged by the A_{280}/A_{260} of 2.0. The measurement of the dehydrogenase activity was performed spectrophotometrically by monitoring the increase in A_{340} (ϵ 6220 M⁻¹·cm⁻¹) in a 0.5 ml reaction mixture containing 1.0 mM betaine aldehyde and 0.5 mM NADP⁺ in a 50 mM potassium phosphate buffer, pH 8.0 (standard assay). A thermostatically controlled Philips PU 8710 spectrophotometer equipped with a kinetics software package was used for the assays, which were conducted at 30 °C. Assays were started by the addition of the enzyme. Steady-state rates were determined from the initial, linear portions of reaction progress curves. Each determination was performed at least in duplicate. Different enzyme preparations gave essentially the same results. One unit of activity is defined as the amount of enzyme catalysing the formation of 1 μ mol of NADPH per min in our standard assay. The specific activity of the enzyme preparation used in this work, determined in the standard assay, was 80 units/mg of protein. Protein concentrations were determined by the Coomassie-G dye binding technique of Bradford [18], with BSA as a standard.

Reaction of BADH with MMTS

Before treatment of the enzyme with MMTS, the BADH preparations were gel-filtered twice by the method of Penefsky [19] to remove 2-mercaptoethanol. The gel-filtration buffer, buffer A, contained 50 mM potassium phosphate, pH 7.5, 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol and 25 mM KCl; it was saturated with nitrogen just before use. MMTS and the enzyme ligands were dissolved in nitrogen-saturated water. BADH (final concentration 0.5 μ M) was incubated with appropriate concentra-

tions of MMTS in the absence or presence of ligands in buffer A at 30 °C. At appropriate intervals, aliquots of the reaction mixture were removed for the measurement of enzyme activity by the standard assay. Activity data were analysed by non-linear regression calculations with a commercial computing program formulated with the algorithm of Marquardt [20]. First-order analyses of time courses of inactivation were performed with:

$$E_t/E_0 = e^{-k_1 t} \quad (1)$$

for a monophasic inactivation or

$$E_t/E_0 = E_1/E_0 e^{-k_1 t} + E_2/E_0 e^{-k_2 t} \quad (2)$$

for biphasic inactivation, where E_t and E_0 are respectively the activity of the enzyme at times t and 0; k , k_1 and k_2 are the observed pseudo-first-order rate constants and E_1 and E_2 are the amplitudes of each phase.

The order of the reaction, n , with respect to MMTS was determined by application of the equation described by Levy et al. [21]:

$$\ln k_{\text{obs}} = \ln k_{\text{inact}} + n \ln [\text{MMTS}] \quad (3)$$

where k_{obs} is the observed pseudo-first-order rate constant of inactivation, as above, k_{inact} is the second-order rate constant of inactivation, and n is the reaction order with respect to MMTS.

The inactivation of BADH by MMTS was reversed by the addition of excess DTT. Aliquots were assayed for activity at the indicated times. First-order analysis of the time courses of the reactivation reaction were performed with the following equation:

$$E_t/E_0 = E_x/E_0 + (1 - E_x/E_0)e^{-k t} \quad (4)$$

where E_t , E_0 and E_x are respectively the activity of the enzyme at times t and zero and at equilibrium (time = ∞) and k is the observed pseudo-first-order rate constant of reactivation.

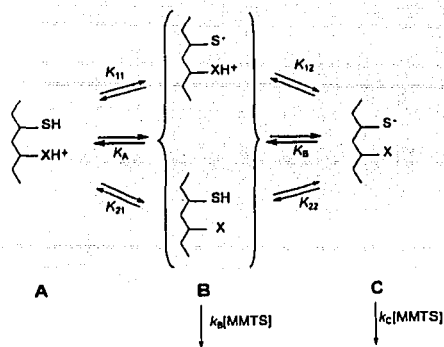
The effect of dinucleotides on BADH inactivation by MMTS was investigated by preincubating the enzyme with the oxidized and reduced coenzyme for different times, as indicated in the Results section, before the addition of MMTS. Residual activity data obtained during the course of the inactivation reaction were fitted to eqn (2).

Thiol titrations with Nbs₂

Thiol groups were determined on native and MMTS-modified BADH (0.9 μ M) by means of Nbs₂ titration [22], with a 200-fold excess of the reagent over the enzyme concentration. Incubations were performed with or without SDS (0.2%, w/v), at 30 °C in 50 mM phosphate buffer, pH 8.0, containing 1 mM EDTA. The number of modified cysteine residues was obtained from the time-dependent increase in A_{412} in a thermostatically controlled Philips PU 8710 spectrophotometer. The absorbance recorded was corrected for the blank (the reaction mixture minus the protein). The number of thiol groups was calculated from a molar absorption coefficient of 13600 M⁻¹·cm⁻¹ [22] for the Nbs₂²⁻ chromophore liberated. The observed changes in absorbance, A , were fitted to a single-exponential equation:

$$A = A_1(1 - e^{-kt}) + c \quad (5)$$

where A_1 is the amplitude of the absorbance change, k is the observed pseudo-first-order constant and c is the absorbance at zero time. Excess thiol reagent and ligands were removed by passage over a Sephadex G-25 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) column. The samples were then titrated with Nbs₂ under either native or denaturing conditions, as described above.


Scheme 1 Mechanism for the ionization of an ion-pair forming thiolate

K_{12} and K_{22} are the microscopic dissociation constants of the proton from the thiol group. K_{21} and K_{12} are the microscopic dissociation constants of the proton from the positively charged group. K_A and K_B are the macroscopic dissociation constants of the proton from the species A and B respectively. k_B and k_C are the second-order rate constants for the reaction of the thiolate in the species B and C with MMTS respectively.

pH studies

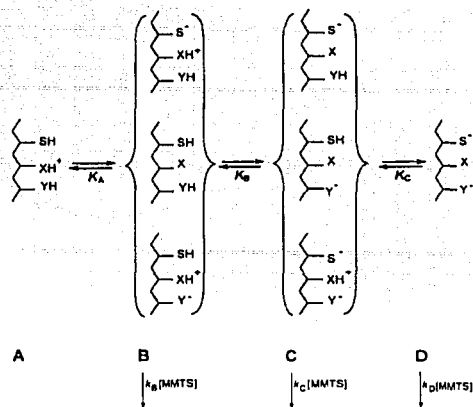
The pH dependence of the inactivation rate was obtained by incubating the enzyme (0.5 μ M, final concentration) with 5 μ M MMTS in a Mes/Hepes/Ches buffer (each at 30 mM), containing 1 mM EDTA and 25 mM KCl together with 600 mM trehalose or 20% (v/v) glycerol, adjusted with KOH to the indicated pH values. We attempted to perform the pH studies in the absence of co-solutes, but *P. aeruginosa* BADH is rapidly inactivated at pH values above 7.5 in the absence of these co-solutes. The enzyme stability was determined by incubating it in the same buffer at 30 °C and at the pH of interest and taking aliquots for assay at pH 8.0 under standard conditions. The aliquots were taken at different intervals, which were as long, at least, as the incubation duration with the modifying reagent. The order of effectiveness of the co-solutes in preventing enzyme inactivation at high pH was 600 mM trehalose > 20% (v/v) glycerol > 20% (w/v) sucrose > 10% (w/v) poly(ethylene glycol). We therefore used trehalose or glycerol as the stabilizing co-solute. The pH range in which the enzyme was stable for the incubation durations and at the temperature employed in these experiments was 4.5–9.5 in the presence of trehalose or 5.5–9.0 in the presence of glycerol. The rate constant of inactivation, k_{obs} , was determined over these pH ranges and the second-order rate constants, k_{inact} , were calculated by dividing k_{obs} by the concentration of MMTS. Results obtained for the pH dependence of k_{inact} were fitted to:

$$k_{\text{inact}} = (k_{11} + k_L \times 10^{pK_A - \text{pH}}) / (1 + 10^{pK_A - \text{pH}}) \quad (6)$$

which was derived for a model with a single ionizable group, where k_{11} and k_L represent the second-order rate constants for the plateau at high and low pH values respectively. For testing the existence of an ion pair, the data were first fitted to:

$$k_{\text{inact}} = (k_B \times 10^{pK_A - \text{pH}} + k_C \times 10^{pH - pK_B}) / (1 + 10^{pK_A - \text{pH}} + 10^{pH - pK_B}) \quad (7)$$

where k_B and k_C are the second-order rate constants for the modification of the thiolate in the species B and C respectively (Scheme 1), pK_A and pK_B are the macroscopic pK values of the


Scheme 2 Proposed mechanism for the ionization of the essential thiolate of BADH from *P. aeruginosa*

K_A , K_B and K_C are the macroscopic dissociation constants of the species from A, B and C respectively. k_B , k_C and k_D are the second-order rate constants for the reaction of the thiolate in the species B, C and D with MMTS respectively.

thiolate in species B and C respectively, and pK_{11} is the microscopic pK of the thiol group in the ion pair (see Scheme 1). Finally, the inactivation results were fitted with:

$$k_{\text{inact}} = (k_{11} \times 10^{pK_A - \text{pH}} + k_C + k_{11} \times 10^{pH - pK_B}) / (1 + 10^{pK_A - \text{pH}} + 10^{pH - pK_B}) \quad (8)$$

which was derived for the mechanism depicted in Scheme 2; the terms are as defined in Scheme 2.

RESULTS AND DISCUSSION

Kinetics of the inactivation of BADH by MMTS

Incubation of *P. aeruginosa* BADH with MMTS in buffer A at pH 7.5 and 30 °C resulted in a time-dependent inactivation of the enzyme following pseudo-first-order kinetics (Figure 1A). In the absence of MMTS, under otherwise identical incubation conditions, virtually no changes in enzymic activity were observed during the experiment. The completely inactivated enzyme recovered 100% of its initial activity when treated with excess DTT (Figure 1A). The reactivation process also followed first-order kinetics.

To test for possible non-covalent binding of MMTS to the enzyme before inactivation, we determined the dependence of the inactivation rate constant on MMTS concentration. As shown in Figure 1(B), the observed pseudo-first-order rate constant for inactivation increased linearly with MMTS concentration. The absence of curvature suggests that, over the concentration range used, no significant E-MMTS complex accumulates during inactivation. Under these experimental conditions, a second-order rate constant of $1.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ was obtained from the slope of the plot in Figure 1(B). The loss of catalytic activity was first-order with respect to MMTS (Figure 1C).

The inactivation of *P. aeruginosa* BADH by MMTS was

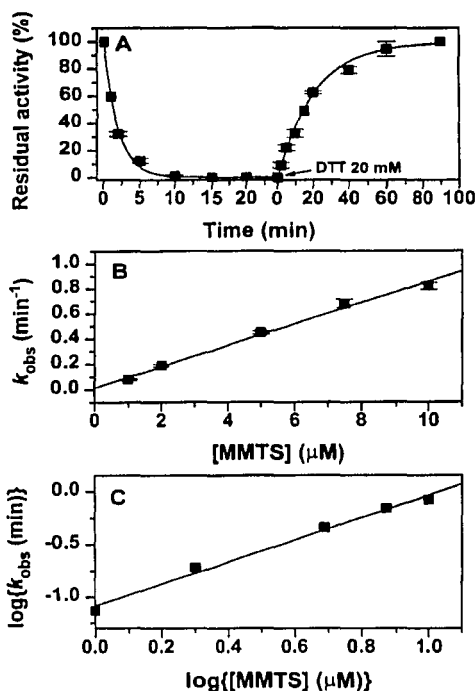


Figure 1 Inactivation of *P. aeruginosa* BADH by MMTS

(A) Time course of inactivation and reactivation by DTT. Enzyme (0.4 μM) was incubated with 5 μM MMTS at 30 °C in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.5, containing 1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol and 25 mM KCl. At the times indicated, aliquots were withdrawn and assayed for remaining activity. The pseudo-first-order rate constant estimated from a fit of the data to eqn (1) was $0.49 \pm 0.03 \text{ min}^{-1}$. After 30 min of reaction, 20 mM DTT was added to the inactivated enzyme and the recovery of activity was followed for an additional 90 min. The best fit of the reactivation data to eqn (4) gives an estimated reverse first-order rate constant (k_{-1}) of $0.042 \pm 0.004 \text{ min}^{-1}$. The points are the experimental data and the lines are the best fit of these data. Results are means \pm S.E.M. for three independent experiments. (B) Dependence of the rate constant for inactivation on MMTS concentration. BADH was incubated with the indicated concentrations of MMTS as in (A) and assayed for remaining activity as a function of time. The observed pseudo-first-order rate constants for inactivation, k_{obs} , were estimated by fitting the experimental data to eqn (1). Results are means \pm S.E.M. for three independent experiments. (C) Determination of the reaction order on MMTS from the data in (B) from eqn (3).

monitored by assaying both the NADP⁺-dependent and NAD⁺-dependent activities under a variety of experimental conditions. There was no significant difference in the rate of loss of the two activities (results not shown).

Thiol quantification of BADH

Titration of pure BADH with Nbs₂ demonstrated the presence of two exposed thiol groups per monomer (Table 1). In the presence of 0.2% SDS four thiol groups were titrated, in full agreement with the primary structure of the enzyme [15]. Previous treatment of BADH with 25 μM MMTS for 20 min, which led to a total loss of enzyme activity, resulted in the modification of three thiol

Table 1 Thiol quantification of active and MMTS-treated BADH

Native and MMTS-treated BADH (0.9 μM) were incubated with Nbs₂ in 50 mM phosphate buffer, pH 8.0, containing 25 mM KCl, 1 mM EDTA and 20% (v/v) glycerol; thiol quantification was performed as described in the Materials and methods section. For MMTS modification, the enzyme was preincubated with 25 μM MMTS for 20 min in the absence and the presence of the indicated ligands. Then the mixture was gel-filtered twice to remove MMTS and ligands and used immediately for thiol quantification. The changes in A_{412} were fitted to eqn (5). Where noted, 20 mM betaine aldehyde (BA), 5 mM NADP⁺ and 1.8 mM NADPH were present during the MMTS inactivation but were absent during thiol quantification. Results are means \pm S.E.M. for two independent experiments.

Addition	Activity (% initial)	No. of thiol groups per monomer	
		- SDS	+ SDS
None	100 \pm 1	2.1 \pm 0.3	4.1 \pm 0.3
MMTS	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.0 \pm 0.0
MMTS/DTT	100 \pm 2	2.3 \pm 0.0	4.3 \pm 0.1
MMTS + BA	79 \pm 1	0.95 \pm 0.1	0.9 \pm 0.0
MMTS + NADP ⁺	76 \pm 2	0.8 \pm 0.0	1.1 \pm 0.1
MMTS + NADP ⁺ + BA	97 \pm 3	1.1 \pm 0.1	0.8 \pm 0.1
MMTS + NADPH + BA	96 \pm 1	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1

groups because no cysteine residues could be titrated with Nbs₂ in the absence of SDS and one was titrated in its presence. When the preincubation duration with MMTS was extended up to 40 min, no cysteine residue could be titrated by Nbs₂ in either the absence or presence of SDS, suggesting that the four cysteine residues were accessible to the thiosulphonate reagent.

The effects of saturating concentrations of the aldehyde substrate and dinucleotides on the number of accessible thiol groups was investigated by treating the enzyme with 25 μM MMTS for 20 min in the presence of saturating concentrations of NADP(H) and betaine aldehyde, alone or in combination. Under these conditions, most of the enzyme activity was protected against MMTS inactivation. After desalting to eliminate MMTS and ligands, Nbs₂ titration of the treated enzyme yielded only one reactive SH group, both in the absence of SDS and in its presence (Table 1). Because the protected enzyme retained most of its initial activity, we conclude that this group belongs to the essential cysteine residue, which was protected against MMTS modification by the active site ligands. This result indicates that the chemical modification of the essential cysteine residue is adequately measured by the loss of enzymic activity. In addition, this finding shows that the binding of substrate, either the aldehyde or the dinucleotides, exposes an additional thiol group. This is the same group that did not react with MMTS in the absence of ligands but under otherwise identical conditions. This effect is most probably due to a ligand-induced conformational change.

pH dependence of the inactivation of BADH by MMTS

The S-methylation of cysteine thiol groups with a reagent such as MMTS is well characterized; it has been shown that the thiolate anion is the reactive species [17]. Consequently, the measurement of the reaction rate as a function of pH can be used to determine the pK values of the thiol group.

The reaction of MMTS with BADH was performed under pseudo-first-order kinetics in a cationic buffer in the presence of 600 mM trehalose or 20% (v/v) glycerol, as described in the Materials and methods section. As shown in Figure 2, the pH profile obtained in the presence of glycerol seems shifted both to the right and downwards when compared with that obtained in the presence of trehalose, suggesting that glycerol causes a

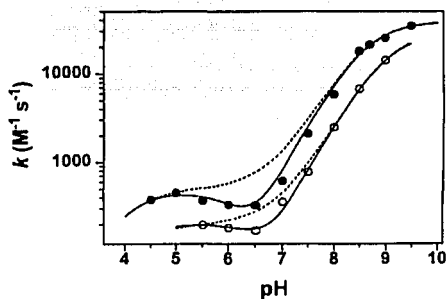


Figure 2 pH dependence of the second-order rate constant for the inactivation of *P. aeruginosa* BADH by MMTS

BADH (0.5 μ M) was incubated with 5 μ M MMTS at the indicated pH values. The buffer used was 30 mM Mes/Hepes/Ches containing 1 mM EDTA and 25 mM KCl together with 20% (v/v) glycerol (○) or 600 mM trehalose (●). Results are means from two independent experiments; S.E.M. values (less than 10% of means) are omitted, given the semilogarithmic nature of the plot. The solid lines were obtained from a non-linear least-squares fit of the data to eqn (8). The broken lines are the best non-linear fit to eqn (7).

greater perturbation than trehalose in the pK of the thiolate group, diminishing its reactivity. However, because we could not determine the pK of this group in the absence of a co-solute, we cannot conclude whether these differences are due to solvent perturbation or to specific co-solute effects.

In both profiles the second-order rate constant for the inactivation of *P. aeruginosa* BADH by MMTS decreased as the pH of the incubation medium was lowered, reaching a plateau at low pH values. Assuming that a protonated thiol is not reactive towards MMTS [23], the theoretical line for the pH dependence of k_{inact} of a simple thiol should reach zero at low pH. For BADH, the pH profile of k_{inact} clearly deviates from that expected for a simple thiol. However, the experimental data can be fitted to eqn (6), corresponding to a mono-sigmoidal profile in which the protonated thiol group is still reactive towards MMTS (fit not shown). The estimated values for the thiol pK in the presence of trehalose or glycerol were 8.63 ± 0.05 and 9.04 ± 0.03 respectively; the limiting second-order rate constants at high and low pH values, k_{H} and k_{L} , respectively, were 3.8×10^4 and $60 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ when trehalose was present, and 2.9×10^4 and $95 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ in the presence of glycerol. Because at low pH the thiol group is mostly protonated, whereas at high pH it is deprotonated, these results indicate that the protonated thiol is approx. 600–300-fold less reactive toward MMTS than the thiolate. It is therefore highly unlikely that this represents a reaction of the protonated thiol because it has been shown that this form is approximately nine or ten orders of magnitude less reactive with MMTS than the thiolate form [23]. Moreover, for a model compound such as 2-mercaptoethanol, it is known that the value of the second-order rate constant for reaction with MMTS at pH values below pH 5.65 is constant and less than $6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ [23]. The latter value is about five orders of magnitude lower than those found by us for BADH inactivation at low pH.

The most plausible reason for the existence of the plateau is therefore that the essential Cys remained ionized in the pH range explored and that the change in its reactivity was due to the titration of another group, as has been found for several other

enzymes [24–29]. This could be explained if the essential Cys residue exists as a ion pair with a positively charged residue, as shown in Scheme 1. In this mechanism the macroscopic acid dissociation constants for the thiolate in the ion pair, K_{A} , and the free thiolate, K_{H} , are related to the microscopic acid dissociation constants by the following relationships:

$$K_{\text{A}} = K_{\text{H1}} + K_{\text{21}} \quad (9)$$

$$K_{\text{H}} = K_{\text{12}} \times K_{\text{22}} / (K_{\text{12}} + K_{\text{22}}) \quad (10)$$

Eqn (9) predicts that the microscopic pK of the thiolate in the ion pair, pK_{H1} , should be higher than pK_{A} ; eqn (10) predicts that the microscopic pK of the free thiolate is lower than pK_{H} .

Because this is a plausible mechanism, we attempted to fit our data to eqn (7), which describes a reaction involving an ion-pair system. Given the impossibility of obtaining experimental data at low pH values because of enzyme instability, we could not obtain enough data to determine unequivocally the macroscopic pK and reactivity of the thiolate in the ion pair, pK_{A} and k_{H} respectively, in Scheme 1. Moreover, there is a mutual dependence between parameters k_{H} and pK_{H1} in eqn (7), so unless the value of pK_{H1} is determined by other means the value of k_{H} cannot be known for certain. Given these uncertainties, we tentatively fitted the values of pK_{A} , pK_{H1} and k_{H} manually, considering that the value of pK_{H1} should be slightly higher than that of pK_{A} . Otherwise the pK for the positively charged group, pK_{21} , would be unreasonably low, as deduced from eqn (9). Then we kept these parameters fixed to obtain, by non-linear regression, the macroscopic pK and the reactivity of the free thiolate, pK_{H} and k_{H} , respectively in Scheme 1. The broken lines in Figure 2 show the fits when pK_{H1} was set at 4.02, pK_{A} at 4.0 and k_{H} at 500 and $215 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, in the presence of trehalose and glycerol respectively. The estimated values for k_{H} and pK_{H} were $(3.9 \pm 0.14) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and 8.66 ± 0.05 when trehalose was present, and $(3.06 \pm 0.15) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ and 9.07 ± 0.04 in the presence of glycerol. As can be seen in Figure 2 (broken lines), at low and high pH a relatively good fit was obtained with eqn (7) but several experimental data in the pH range 5.5–7.5 clearly deviated from the theoretical line resulting from this fit. The deviation was consistently present in both data sets, those obtained in the presence of trehalose or glycerol. These deviations of the experimental from the expected values might indicate that the protonation status of a third group was affecting the reactivity of the thiolate, as in the mechanism depicted in Scheme 2. In *P. aeruginosa* BADH, deprotonation of this enzyme group seems to restrict sterically the accessibility of the essential thiolate to the solvent, thus decreasing its reactivity, whereas deprotonation of the positively charged residue increases the reactivity of the essential thiol, by increasing its pK (which in turn increases its intrinsic reactivity) and/or its exposure to the solvent. Accordingly, our data were then best fitted to eqn (8), which was derived for the model in Scheme 2. We set pK_{A} and k_{H} to the values given above, manually fitted pK_{H} and k_{L} , and obtained, by non-linear regression, the values of pK_{H} and k_{L} . The solid lines in Figure 2 show the fit to eqn (8); the estimated values for the parameters are given in Table 2.

There have been numerous reports on the chemical modification of the essential thiol group of aldehyde dehydrogenases [30–35]. Moreover, the mechanism of the irreversible inhibition of aldehyde dehydrogenases by disulfiram, a drug widely used in aversion therapy for alcoholism, or its metabolites has been proved to involve the modification of this essential group [36–40]. However, there have been few studies on the factors modulating its reactivity. To the best of our knowledge these studies have been conducted only on phosphorylating [26,29,41,42] and non-phosphorylating [43] glyceraldehyde-3-phosphate dehydro-

Table 2 Second-order rate constants for the inactivation by MMTS and macroscopic pK values of the essential thiolate

Results shown are parameters (means \pm S.E.M.) estimated from a fit of the inactivation data shown in Figure 2 (apoenzyme) to eqn (8) and those shown in Figure 3 (holoenzyme) to eqn (7). Parameters fitted manually are those without S.E.M.

Enzyme form	Co-solute	Rate constants ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)			Macroscopic pK values		
		k_e	k_c	k_0	pK_A	pK_B	pK_C
Apoenzyme	Trehalose	500	5	$(3.83 \pm 0.13) \times 10^4$	4	6.2	8.63 ± 0.04
	Glycerol	215	48	$(2.86 \pm 0.03) \times 10^4$	4	6.6	9.01 ± 0.01
Holoenzyme	Trehalose	5000	—	$(1.40 \pm 0.05) \times 10^4$	4	—	7.44 ± 0.10

genases, although possible mechanisms for the enhanced thiol reactivity of the cytoplasmic sheep liver aldehyde dehydrogenase have been discussed [44]. Chemical activation of the thiol of the essential Cys residue by ion-pair formation with a positively charged residue has been found in some cases [26,42]. Our results suggest that the macroscopic pK of the essential thiol in *P. aeruginosa* BADH is also lowered by ion-pair formation. Although we could not precisely determine the extent of this decrease, owing to experimental difficulties arising from enzyme instability at low pH, we can conclude from our data that this pK should be 4 or lower. We do not yet know the identity of the positively charged residue forming the ionic pair with Cys²⁸⁶. On the basis of a three-dimensional model of *P. aeruginosa* BADH obtained from the crystal coordinates of cod liver BADH [45] (model not shown), the only possible candidates are Lys³⁶⁶ and His³⁵³, which in the model are respectively 10 and 13 Å from Cys²⁸⁶ (1 Å \equiv 0.1 nm). These residues seem too distant to be involved in charge-charge interactions with the essential cysteine residue but we cannot rule out its participation because these measurements were made on a model. Site-directed mutagenesis experiments are under way to define whether any of these residues are involved in the ion-pair formation.

It is known that the thiolate basicity, i.e. the thiol pK, affects its intrinsic reactivity, measured here as the rate constant for MMTS modification, k_e , in a way predicted by the Bronsted equation:

$$\log k_e = \log G + \beta pK \quad (11)$$

Considering the experimentally determined values for alkyl thiols of 3.54 for $\log G$ and of 0.309 for β [27], the reactivity of a simple alkyl thiolate of pK 4.0 should be $5.9 \times 10^4 M^{-1} \cdot s^{-1}$, whereas that of a thiolate of pK 8.66 or 9.07 should be 1.6×10^6 or $2.2 \times 10^6 M^{-1} \cdot s^{-1}$ respectively. Thus the reactivity of Cys²⁸⁶ towards MMTS seems to be significantly lower than expected, about 120–270-fold when forming an ion pair and about 40–70-fold when it is a free thiolate. The reactivity of protein thiols depends not only on the fraction of the group in the thiolate form or on the basicity of the thiolate but also on its accessibility, i.e. whether is on the protein's surface or buried. It therefore seems that there is significant steric inhibition of the reaction of Cys²⁸⁶ with MMTS that is partly relieved at high pH.

If the thiolate in species B and C were fully exposed to the solvent, the measured reactivity of these species would be related to the microscopic acid dissociation constants of the thiolate K_{11} and K_{22} by the relationship [28]:

$$k_{11} = k_i (10^{pK_{11} - pK_{22}}) \quad (12)$$

However, eqn (12) cannot be applied to *P. aeruginosa* BADH owing to different steric effects of the protein environment on the thiolate reactivity at low and high pH values. It is therefore

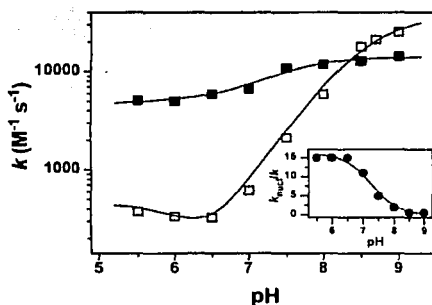


Figure 3 pH dependence of the second-order rate constant of inactivation of BADH by MMTS at saturating concentrations of NADP*

BADH (0.5 μM) was incubated with 5 μM MMTS in the presence of 6 mM NADP* (added to the apoenzyme 2 min before treatment with MMTS) (■) at the indicated pH values. Results are means from two independent experiments. S.E.M. values (less than 15% of means) are omitted, given the semilogarithmic nature of the plot. The line is the best fit of the data to eqn (7). Data from Figure 2, obtained in the absence of NADP* but under otherwise identical experimental conditions, are included for comparison (□). Inset: pH profile of the ratio of the second-order rate constant observed in the presence of NADP*, k_{holo} , to the second-order rate constant observed in its absence, k_{apo} . The line in the inset is the best fit of the points to the equation for a single ionizable group.

impossible to calculate the pK for the free thiolate, pK_{22} , even if we assume that the pK in the ion pair, pK_{11} , is that estimated by us.

Effect of dinucleotides on the reactivity of the essential cysteine residue

To determine the pK of the essential thiol group in the binary complex enzyme–dinucleotide, we investigated the pH dependence (in the pH range 5.5–9.0) of the pseudo-first-order rate constant of inactivation at saturating concentrations (6 mM) of NADP*, which is about 100-fold the corresponding K_i for NADP* over the whole pH range studied. Incubations were performed in Mes/Hepes/Ches buffer plus 600 mM trehalose, as described in the Materials and methods section. We found that incubation of the enzyme with MMTS in the presence of NADP* resulted in a biphasic loss of catalytic activity: a first phase with a high thiolate reactivity was followed by a second phase with a much lower reactivity (results not shown). The apparent pseudo-first-order rate constant for inactivation and the amplitude of the two phases were therefore estimated from a fit of the data to a double-exponential equation [eqn (2)]. Second-order rate constants for inactivation were then determined by dividing those estimates by the MMTS concentration. Figure 3 shows the pH profile for the reactivity of the essential cysteine residue in the enzyme–NADP* complex, as measured by the second-order rate constant of the first inactivation phase. This profile shows clearly that the thiolate in the holoenzyme is still chemically activated by forming an ion pair with a positively charged residue, which on deprotonation increases the pK of the thiol and consequently its reactivity. In addition, in the presence of saturating concentrations of NADP* the reactivity of the thiolate increases significantly at pH values of 8.0 and lower, in comparison with that obtained in the absence of the dinucleotide. The binding of NADP* largely eliminates the effect of the residue named YH in Scheme 2 on the reactivity of the essential thiolate, so the

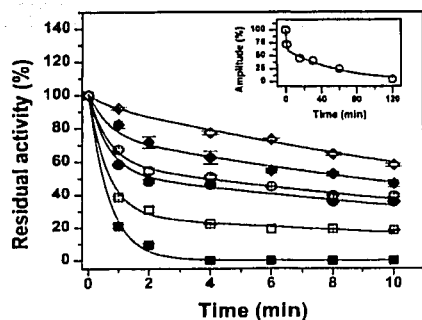


Figure 4 Effect of NADH on the inactivation of BADH by MMTS

BADH (0.5 μ M) was inactivated with 5 μ M MMTS in the absence (■) or presence of 6 mM NADH, which had been added to the enzyme 1 (□), 15 (●), 30 (○), 60 (◆) and 120 (◇) min before treatment with MMTS. The buffer used was 30 mM Mes/Hepes/Ches, pH 8.0, containing 1 mM EDTA, 25 mM KCl and 600 mM trehalose. Results are means \pm S.E.M. for two independent experiments. The data obtained in the absence of dinucleotide were fitted to eqn (1) and those obtained in the presence of dinucleotide were fitted to eqn (2). Inset: a plot of the amplitude of the first inactivation phase against time.

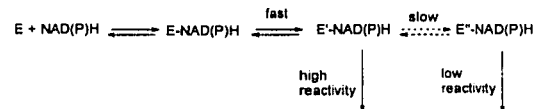
Inactivation data obtained for the holoenzyme can be fitted to eqn (7) by following the same procedure as above, i.e. by manually fitting the reactivity and the pK for the thiolate in the ion pair, k_{11} and pK_A , and estimating by non-linear regression the values of the reactivity and the pK of the free thiolate, which are given in Table 2 as k_{11} and pK_f , respectively. The results of this fit are given in Table 2. The estimated macroscopic pK for the free thiolate is 1.2 pH units lower than that estimated in the absence of $NADP^+$. Because this value should be higher than any of the microscopic pK values of the two groups involved in ion pairing, it sets a higher limit for the free thiolate pK . The second-order rate constant for modification of the thiolate in the ion pair is 10-fold higher in the holoenzyme than in the apoenzyme, whereas that for the free thiolate is 2.7-fold smaller. The later decrease in thiolate intrinsic reactivity is consistent with that expected if the pK of the group is 1.2 pH units lower, in line with eqn (11). Qualitatively, the same activation effects were observed with NAD^+ and $NAD(P)H$ (results not shown); they are therefore not attributable to chemical activation by the positive charge of $NADP^+$. These findings provide evidence for a conformational activation of the essential Cys^{266} after dinucleotide binding, suggesting that at pH values below 8.0 this binding triggers a rearrangement of the active site, leading to a more 'open' conformation. The changes in thiolate reactivity were fully reversed when the nucleotides were removed from the enzyme preparation by desalting (results not shown).

It is interesting that as the pH was increased from 5.5 to 9.0 the ratio between the second-order rate constant for inactivation in the presence of $NADP^+$, k_{inact} , to that in its absence, k , progressively diminished until it reached approx. 0.7 at pH 9.0. The pH profile of this ratio, shown in the inset of Figure 3, suggests that the protonation of a group of pK 7.16 \pm 0.07 is involved in the rapid change in Cys^{266} reactivity promoted by dinucleotide binding. It seems that the rapid dinucleotide-induced rearrangement of the active site, which results in a more 'open' conformation, requires that a certain group of the enzyme be protonated.

Table 3 Effect of dinucleotides on the reactivity of the essential thiolate and kinetics of the slow dinucleotide-induced conformational change

BADH (0.5 μ M) was preincubated with 6 mM dinucleotides for different durations and then treated with 5 μ M MMTS under the conditions given in the legend to Figure 4. The thiolate reactivity of the two holoenzyme forms E' and E'' is expressed as the second-order rate constant for the first and second phase of inactivation respectively. Results shown are parameters estimated from a fit of the data (means \pm S.E.M. for two independent experiments) to eqn (2). The kinetics of the slow dinucleotide-induced conformational change is given as the first-order rate constant of the two phases, k_{obs1} and k_{obs2} , for the change in the relative concentration of E' (see the text for details). Eqn (2) was used to fit these data.

Nucleotide	Thiolate reactivity		Conformational change	
	k_{inact1} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{inact2} ($M^{-1} \cdot s^{-1}$)	k_{obs1} (s^{-1})	k_{obs2} (s^{-1})
NAD^+	$(4.3 \pm 0.9) \times 10^3$	147 \pm 30	84 \pm 12	1.9 \pm 0.2
$NADP^+$	$(5.0 \pm 1.5) \times 10^3$	123 \pm 43	158 \pm 44	1.3 \pm 0.0
NADH	$(5.0 \pm 0.1) \times 10^3$	127 \pm 33	85 \pm 32	0.9 \pm 0.2
NADPH	$(7.3 \pm 1.1) \times 10^3$	260 \pm 20	183 \pm 20	1.3 \pm 0.2



Scheme 3 Proposed mechanism for the changes in the essential thiolate reactivity elicited by binding of the dinucleotides to BADH from *P. aeruginosa*

E' and E'' are different holoenzyme conformations with a high- and low-reactive essential thiolate respectively.

Several reasons could account for the existence of the two distinguishable inactivation rates in the whole pH range studied when the dinucleotide-saturated BADH is treated with MMTS. The enzyme preparation is homogeneous, so the presence of isoenzymes cannot be the cause of this anomalous behaviour. Because *P. aeruginosa* BADH is dimeric, negative co-operativity between the two active sites in the reaction with MMTS could account for a biphasic inactivation process, i.e. modification of the first active site by MMTS could lead to a decreased reactivity of the second active site in the same BADH molecule. However, this possibility seems unlikely because such co-operativity was not observed in the absence of the dinucleotide. It is also possible that binding of $NAD(P)^+$ or $NAD(P)H$ triggers an additional, and relatively slow, conformational change that eventually makes the thiolate less accessible to the solvent. To test the latter possibility, reaction of the enzyme with MMTS was initiated after different preincubation periods with $NAD(P)^+$ or $NAD(P)H$. Figure 4 depicts the time course of inactivation by MMTS at pH 8.0, with and without preincubation of the enzyme with NADH. Similar results were obtained with the other three dinucleotides (results not shown). We found that for each dinucleotide the whole set of residual activity data could be fitted to eqn (2), yielding the values of second-order rate constants for inactivation given in Table 3. As the preincubation time increased, the amplitude of the first rapid inactivation phase decreased, but the rate constants for the two phases remained unchanged. The minimal mechanism that accounts for these results is that in Scheme 3, in which the holoenzyme, after binding the dinucleotide, undergoes at least two conformational changes, the first leading to a form, E' , with a very reactive

thiolate followed by another conformational change resulting in a form, E' , with a thiolate at least 40-fold less reactive than the former. The relative concentrations of both forms are given by the amplitudes of the two phases. The inset to Figure 4 shows the time course of the conformational change elicited by NADH, as determined by the changes in the amplitude of the first inactivation phase. The best fit of these data was obtained by using a double-exponential equation, considering that at zero time of preincubation 100% of the holoenzyme is already in the conformation E' . This indicates that the conformational change leading to the initial increase in thiolate reactivity is so fast that it cannot be resolved by standard procedures and that the conformational change leading to a very unreactive thiolate takes place in at least two steps, with the first-order rate constants given in Table 3. The kinetics of the conformational changes triggered by the four dinucleotides tested are qualitatively identical and quantitatively very similar, although the conformational changes induced by NADP(H) seem to be faster than those induced by NAD(H).

Taken together, our results indicate that the binding of dinucleotides has two effects on the reactivity of thiolate towards MMTS: (1) a transitory increase in its reactivity at pH values below 8.5, resulting from a very rapid conformational change, and (2) a subsequent large decrease in reactivity as a result of a slow conformational change. Marchal and Branlant [43] have reported dinucleotide-induced changes in the reactivity of the essential thiolate of the non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. However, their findings differ significantly from ours in that they observed a rapid initial decrease in the reactivity of the thiolate on binding of the dinucleotide, followed by a slow increase in its reactivity.

Both dinucleotide-induced conformational changes are reversed on removal of the dinucleotide. The slow conformational change is presumably rapidly reversed after binding of the aldehyde to the holoenzyme, because the enzyme activity at saturating substrate concentration was not affected by preincubation of the enzyme with the dinucleotide (results not shown). However, we were unable to measure the reactivity of the essential thiol in the presence of both substrates, given the high level of protection against MMTS inactivation afforded by the aldehyde.

We can speculate about the possible implications that our findings on the modulation of the reactivity of the essential thiolate at pH values around neutrality have for BADH activity. The active-site conformation of the apoenzyme results in a low reactivity of the essential thiol, even though most of it is as thiolate. This 'close' conformation most probably protects the apoenzyme from inactivation by oxidation. Accordingly, we have found that *P. aeruginosa* BADH can remain active for a long period after removal of the reductant used to protect it against oxidation by ambient O_2 . The binding of the dinucleotide rapidly increases Cys^{266} reactivity, most probably because of an increase in the accessibility of its thiol group to the solvent. This in turn results in an enhanced rate of thiohemiacetal formation with the aldehyde substrate. Thus the rapid dinucleotide-induced conformational change probably produces a holoenzyme with a higher affinity than the apoenzyme for betaine aldehyde. The kinetic mechanism of *P. aeruginosa* BADH is consistent with this proposal, because the dinucleotide is the preferred first substrate [1]. In contrast, the high reactivity of the essential thiol group in the holoenzyme might be deleterious because it increases the risk of oxidation of this group. Therefore the slow dinucleotide-induced change, resulting in an enzyme conformation with an almost unreactive essential thiol, would give substantial protection against holoenzyme inactivation. This protective effect

might be relevant if the aldehyde concentrations are below those required for enzyme saturation. Thus it seems that, to gain protection against thiolate oxidation without compromising catalytic efficiency, BADH from *P. aeruginosa* has evolved a complex mechanism, involving several conformational rearrangements of the active site, to suit the reactivity of the essential thiol to the availability of dinucleotide and substrate.

We thank Dr Mario Calcagno, UNAM, for a critical reading of the English version. This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-2552P-N) and the Dirección General de Apoyo al Personal Académico de la UNAM (DGAPA-IN 210198) L.G.-S. is a recipient of scholarships from CONACYT and Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

REFERENCES

- Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y. and Ogata, K. (1976) Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16. *Agr Biol Chem* **40**, 1743–1749.
- Csonka, L. N. and Hanson, A. D. (1991) Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu Rev Microbiol* **45**, 569–606.
- Rhodes, D. and Hanson, A. D. (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**, 357–384.
- D'Souza-Ault, M. R., Smith, L. T. and Smith, G. M. (1993) Roles of *N*-acetylglutaminylglutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* **59**, 473–478.
- Lisa, T. A., Casale, C. H. and 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.
- Kilbourne, J. P. (1978) Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis. *Lancet* **i**, 334.
- Renick, B. R. (1981) Renal tubule transport of organic ions. *Am J Physiol* **240**, F83–F89.
- Pepson, S. R. and Candia, O. A. (1982) Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **22**, 651–659.
- Wright, J. R. and Clements, J. A. (1987) Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am Rev Respir Dis* **136**, 426–444.
- Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. and Muñoz-Clares, R. A. (1999) Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 1292–1300.
- Velasco-García, R., González-Segura, L. and Muñoz-Clares, R. A. (2000) Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* **352**, 675–683.
- Blatter, E. E., Abriola, P. D. and Pietruszko, R. (1992) Aldehyde dehydrogenase. Covalent intermediate in aldehyde dehydrogenation and ester hydrolysis. *Biochem J* **282**, 353–360.
- Hempel, J., Nicholas, H. and Lindahl, R. (1993) Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Protein Sci* **2**, 1890–1900.
- Farres, J., Wang, T. T. Y., Cunningham, S. J. and Weiner, H. (1995) Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **34**, 2592–2598.
- Slover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hutnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M. et al. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature (London)* **408**, 959–964.
- Perazich, J., Nicholas, H., Wang, B.-C., Lindahl, R. and Hempel, J. (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci* **8**, 137–146.
- Smith, D. J., Maggio, E. T. and Lenyon, G. L. (1975) Simple alkane-thiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry* **14**, 766–771.
- 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.
- Penefsky, H. S. (1977) Reversible binding of P_i by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **252**, 2891–2899.
- Marquardt, D. W. (1963) An algorithm for least-squares estimation of non-linear parameters. *J Soc Ind Appl Math* **11**, 431–441.
- Levy, H. M., Leber, P. D. and Ryan, E. M. (1963) Inactivation of myosin by 2,4-dinitrophenol and protection by adenosine triphosphate and other phosphate compounds. *J Biol Chem* **238**, 3654–3659.
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70–77.

- 23 Roberts, D. D., Lewis, S. D., Ballou, D. P., Olson, S. T. and Shafer, J. A. (1986) Reactivity of small thiolate anions and cysteine-25 in papain toward methyl methanethiosulfonate. *Biochemistry* **25**, 5595–5601
- 24 Bednar, R. A. (1990) Reactivity and pH dependence of thiol conjugation to *N*-ethylmaleimide: detection of a conformational change in chalcone isomerase. *Biochemistry* **29**, 3684–3690
- 25 Polgár, L. (1973) On the mode of activation of the catalytically essential sulphydryl group of papain. *Eur. J. Biochem.* **33**, 104–109
- 26 Polgár, L. (1973) Ion-pair formation as a source of enhanced reactivity of the essential thiol group of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **51**, 63–71
- 27 Lo Bello, M., Parker, M. W., Desideri, A., Politicelli, F., Falconi, M., Del Boccio, G., Pennelli, A., Federici, G. and Ricci, G. (1993) Peculiar spectroscopic and kinetic properties of Cys-47 in human placental glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* **268**, 19033–19038
- 28 Nelson, J. W. and Creighton, T. E. (1994) Reactivity and ionization of the active site cysteine residues of DsbA, a protein required for disulfide bond formation in vivo. *Biochemistry* **33**, 5974–5983
- 29 Tallourier, F., Colloch, N., Mornon, J. P. and Branlant, G. (1998) Comparative study of the catalytic domain of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from bacteria and archaea via essential cysteine probes and site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **252**, 447–457
- 30 Hempel, J., Pietruszko, R., Fietzek, P. and Jornvall, H. (1982) Identification of a segment containing a reactive cysteine residue in human liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase (isoenzyme E.). *Biochemistry* **21**, 6834–6838
- 31 von Bahr-Lindstrom, H., Jeck, R., Woenckhaus, C., Sonn, S., Hempel, J. and Jornvall, H. (1985) Characterization of the coenzyme binding site of liver aldehyde dehydrogenase: differential reactivity of coenzyme analogues. *Biochemistry* **24**, 5847–5851
- 32 Blatter, E. E., Tasayco, M. L., Pretschw, G. and Pietruszko, R. (1990) Chemical modification of aldehyde dehydrogenase by a vinyl ketone analogue of an insect pheromone. *Biochem. J.* **272**, 351–358
- 33 Abriola, D. P., MacKerell, A. D. and Pietruszko, R. (1990) Correlation of loss activity of human aldehyde dehydrogenase with reaction of bromoacetophenone with glutamic acid-266 and cysteine-302 residues. *Biochem. J.* **266**, 179–187
- 34 Blatter, E. E., Abriola, D. P. and Pietruszko, R. (1992) Aldehyde dehydrogenase. Covalent intermediate in aldehyde dehydrogenation and ester hydrolysis. *Biochem. J.* **282**, 353–360
- 35 Kitson, T. M., Hill, J. P. and Midwinter, G. G. (1991) Identification of a catalytically essential nucleophilic residue in sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* **275**, 207–210
- 36 Vallari, R. C. and Pietruszko, R. (1982) Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition by disulfiram. *Science* **216**, 637–639
- 37 Kitson, T. M. (1982) Further studies of the action of disulfiram and 2,2'-dithiopyridine on the dehydrogenase and esterase activities of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* **203**, 743–754
- 38 MacKerell, Jr., A. D., Vallari, R. C. and Pietruszko, R. (1985) Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase inhibition by diethylthiocarbamic acid methanethiol mixed disulfide: a derivative of disulfiram. *FEBS Lett.* **179**, 77–81
- 39 Dickinson, F. M. (1996) The purification and some properties of the Mg²⁺-activated cytosolic aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **315**, 393–399
- 40 Lipsky, J. J., Shen, M. L. and Naylor, S. (2001) Overview – *in vitro* inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chem. Biol. Interact.* **130–132**, 81–91
- 41 Tallourier, F., Colloch, N., Mornon, J. P. and Branlant, G. (1999) Functional characterization of the phosphorylating D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Methanothermobacter thermophilus* by comparative molecular modeling and site directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **265**, 93–104
- 42 Soukri, A., Mougín, A., Corbier, C., Wonacott, A. J. and Branlant, G. (1989) Role of histidine 176 residue in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **28**, 2586–2592
- 43 Marchal, S. and Branlant, G. (1999) Evidence of the chemical activation of essential Cys-302 upon cofactor binding to non-phosphorylating glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Biochemistry* **38**, 12950–12958
- 44 Kitson, T. M. (1981) The inactivation of aldehyde dehydrogenase by disulfiram in the presence of glutathione. *Biochem. J.* **199**, 255–258
- 45 Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jornvall, H. and Eklund, H. (1998) Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Sci.* **7**, 2106–2117

Received 4 June 2001/24 October 2001; accepted 7 November 2001



El segundo artículo se titula "Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves affecting the reactivity of the catalytic thiol" y fue publicado en la revista *Chemico-Biological Interactions*. En este artículo se presenta una comparación de los cambios conformacionales inducidos por los ligandos, no sólo por los dinucleótidos sino también por la betaína aldehído, de las enzimas BADH de *P. aeruginosa* y de *A. hypochondriacus* que afectan la reactividad de la cisteína esencial. El estudio se hizo a valores de pH cercanos a los fisiológicos, 7.0 para la enzima bacteriana y 8.0 para la de la planta. Mi contribución en este trabajo fue el estudio de la reactividad frente a MMTS de la cisteína esencial de la enzima BADH de *P. aeruginosa*. A pH 7.0, en ausencia de ligandos, encontramos una cinética de inactivación bifásica, a diferencia de lo que habíamos encontrado a pH 8.0, en el que la cinética de inactivación era claramente monofásica. La inactivación bifásica sugiere la existencia, aun en ausencia de ligandos, de dos formas de la enzima, que difieren en la reactividad del tiolato catalítico y que se encuentran en un equilibrio que puede ser desplazado por los ligandos.

La modificación química de la BADH por MMTS en presencia de la betaína aldehído también fue bifásica, como la que se observó con las coenzimas. Esta inactivación bifásica se convirtió en monofásica después de 30 min de preincubación, perdiéndose la forma más reactiva. Inesperadamente, la betaína aldehído ofreció menos protección que las coenzimas contra la inactivación química de la cisteína esencial, lo que sugiere que su unión a la enzima libre no involucra una interacción con el tiolato catalítico. Esta interacción probablemente se dé después de que se haya unido el nucleótido.

El comportamiento bifásico del proceso de inactivación de la enzima en presencia de los dinucleótidos y de la betaína aldehído no se debe a la existencia de isoenzimas, ya que la preparación de la enzima es homogénea de acuerdo con los siguientes criterios: 1) los perfiles de elución de las cromatografías de afinidad (2',5'-ADP-sefarosa) y de exclusión molecular revelan un solo pico de proteína simétrico con una actividad específica de BADH constante; 2) la electroforesis en geles de acrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de la preparación de la enzima BADH pura muestran sólo una banda de proteína; 3) los geles de isoelectroenfoque de la preparación de la enzima BADH pura

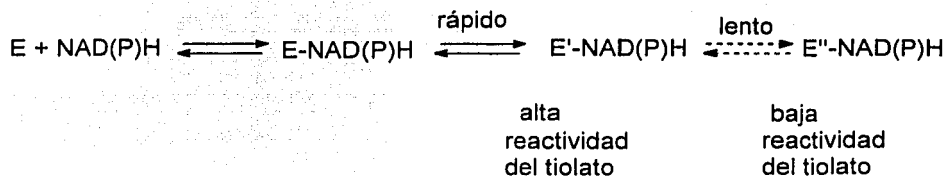
mostraron una sola banda de proteína con un pI de 5.1 (Velasco-García *et al.*, 1999) y 4) sólo se obtuvo una secuencia para la región amino terminal de la enzima (Velasco-García *et al.*, 1999). Otra posible explicación a esta cinética bifásica de inactivación es que la enzima BADH presentara cooperatividad negativa entre sus sitios activos en la reacción con MMTS. En otras palabras, la inactivación del primer o primeros sitio(s) activo(s) por MMTS pudiera producir una disminución en la reactividad de los otros sitios activos no modificados de la misma molécula de BADH. Sin embargo, este mecanismo parece poco probable porque la amplitud de las dos fases cambia a medida que se prolonga la incubación con el ligando, lo que sugiere más bien o un cambio conformacional lento inducido por su unión (como se muestra en la Figura 16A), o un desplazamiento de un equilibrio existente entre dos formas de la enzima, que difieren en la reactividad del tiolato, (como se muestra en la Figura 16B). Los resultados a pH 7.0, en los que se observó la cinética bifásica de inactivación en ausencia de ligando, parecen apoyar el segundo de estos dos mecanismos (Figura 16B). Las dos formas de la enzima, E' con un tiolato muy reactivo o más accesible y E'', con un tiolato menos reactivo o menos accesible, podrían estar presentes *in vivo*, y cuando se lleva a cabo la preincubación con cualquier ligando se produciría un desplazamiento lento del equilibrio hacia la forma E''. Ambas formas serían capaces de unir a los ligandos, aunque la forma E'' los uniría preferentemente. La proporción de estas dos formas en el equilibrio en ausencia de ligandos parece depender del pH al que se encuentran.

En presencia de los dos sustratos, la reacción se llevaría a cabo con la forma de alta reactividad, ya que el desplazamiento del equilibrio es lento y ésta es la mayoritaria a los valores de pH estudiados, pero si sólo uno de los sustratos se une y la reacción no se lleva a cabo, el equilibrio se desplazaría hacia la forma no reactiva "protegida". Por ello los cambios conformacionales propuestos para la BADH podrían ser importantes no sólo para el funcionamiento de la enzima sino también para su protección contra la oxidación.

En experimentos de modificación química de la BADH de amaranto por iodoacetamida (Muñoz-Clares *et al.*, 2003) y disulfiram (Velasco-García *et al.*, 2003) y de la enzima de riñón de cerdo por disulfiram (Velasco-García *et al.*, 2003) también se observaron cinéticas

de inactivación bifásicas en ausencia de ligandos, tal y como se observa en la BADH de *P. aeruginosa*, lo cual sugiere que éste es un fenómeno que pudiera ser general en las BADHs.

A



B

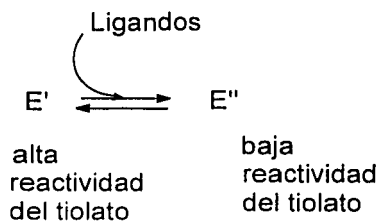


Figura 16. Mecanismos propuestos para explicar la cinética bifásica y los cambios en reactividad de la cisteína catalítica de la enzima BADH de *P. aeruginosa* inducidos por la unión de los ligandos

Los resultados de estos dos trabajos en conjunto, sugieren que la BADH de *P. aeruginosa* ha desarrollado un mecanismo por el que los ligandos inducen ya sea cambios conformacionales o el desplazamiento de un equilibrio preexistente entre dos formas de la enzima. Este mecanismo podría ser importante para conferir a la enzima protección contra una posible inactivación por oxidación del tiolato catalítico en un ambiente con oxígeno y/o especies reactivas de oxígeno, como se discutió anteriormente.

TRABAJOS CON
FALLA DE ORIGEN

VII.2.2. Artículo II.

“Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves affecting the reactivity of the catalytic thiol”



Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves affecting the reactivity of the catalytic thiol

Rosario A. Muñoz-Clares*, Lilian González-Segura, Carlos Mújica-Jiménez, Lilia Contreras-Díaz

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México

Abstract

The reaction catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) involves the nucleophilic attack of a catalytic cysteinyl residue on the aldehyde substrate. As a possible mechanism of regulation, we have studied the modulation by ligands of the reactivity and/or accessibility of the essential thiol of the enzyme from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* and the leaves of the plant *Amaranthus hypochondriacus* (amaranth). In the absence of ligands, the kinetics of inactivation by thiol modifying reagents of both enzymes were biphasic, suggesting the existence of two enzyme conformers differing in the reactivity of their catalytic thiolate. Preincubation of *P. aeruginosa* BADH with the coenzymes or the aldehyde prior to the chemical modification brought about active site rearrangements that resulted in an important decrease in the inactivation rate. Amaranth BADH responded similarly to the preincubation with NADH or betaine aldehyde but NAD⁺ elicited opposite changes, increasing the rate of inactivation after prolonged preincubation. In amaranth BADH, the different behavior of both coenzymes, and the observed biphasic inactivation kinetics are consistent with the previously proposed iso kinetic mechanism, characterized by the existence of two interconvertible apoenzyme forms, one able to bind NAD⁺ and the other NADH. Taken together, our results suggest that ligand-induced conformational changes in BADH from the two sources studied might be important for both proper enzyme function and protection against oxidation.

© 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Betaine aldehyde dehydrogenase; *Pseudomonas aeruginosa*; *Amaranthus hypochondriacus* L.; Conformational changes; Catalytic thiol reactivity; Chemical modification

1. Introduction

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, E.C. 1.2.1.8) catalyzes the irreversible oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine with the concomitant reduction of NAD(P)⁺ to

* Corresponding author. Tel.: +52-55-56225276; fax: +52-55-56225329

E-mail address: clares@servidor.unam.mx (R.A. Muñoz-Clares).

NADP(H). In bacteria, algae, fungi, higher plants, and animals this reaction is the final step in the biosynthesis of the very efficient osmoprotectant glycine betaine [1–6]. In most organisms, glycine betaine is a non-metabolizable osmolite, which accumulates to high concentrations to prevent water loss and protect cellular components against dehydration or high ionic concentrations [7]. In contrast, glycine betaine is a metabolic intermediate in the catabolism of choline or choline precursors in microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa* [8] when they are grown in these compounds as their sole carbon, nitrogen and energy source. The BADH catalyzed reaction in these bacteria fulfills an amphibolic function providing both NADH and NADPH [9]. Since osmotic stress [10] and choline or choline precursors [11,12] are both present in the tissues infected by the bacteria, it is conceivable that BADH is a key enzyme in the establishment and growth of the pathogen.

Although the physicochemical and kinetic properties of *P. aeruginosa* [9,13] and amaranth leaves [5,14] BADHs have been studied, little attention has been devoted to the study of their possible regulatory mechanisms, other than those involving gene expression control by choline in *P. aeruginosa* [8] and osmotic stress in amaranth [5,15]. So far no mechanism for a short-term regulation of these two BADHs, or of any other, has been described. There are no known effectors of their activity and both enzymes follow Michaelis-Menten kinetics for the aldehyde and the coenzyme [5,9,13,14]. To investigate if BADH activity is modulated in a medium- or short-term, we have tested a possible mechanism of regulation involving ligand-induced conformational changes.

The reaction catalyzed by most aldehyde dehydrogenases known to date involves the nucleophilic attack of a catalytic cysteinyl residue on the aldehyde substrate [16]. This cysteine is a conserved residue in all aldehyde dehydrogenases so far sequenced [16]. Alignment of the *Pseudomonas* [17] and amaranth [15] BADH sequences with the other aldehyde dehydrogenase sequences [18] indicates that Cys286 and Cys294 are the conserved cysteinyl residue in the bacterial and plant enzyme, respectively, and likely to be the nucleophile

involved in thiohemiacetal formation. Site-directed mutagenesis confirmed this supposition in the case of the *Pseudomonas* enzyme Cys286 (Velasco-García and Muñoz-Clares, unpublished work). The chemical modification of the catalytic cysteinyl residue is conveniently measured by the loss in enzymic activity, which allowed us to investigate the modulation of its reactivity by the binding of ligands to the enzyme.

The reactivity of a protein thiol group is determined mainly by three factors: (i) the fraction of the thiol that is present as the thiolate form, which depends on its p*K*; (ii) the intrinsic reactivity of the thiolate, which is dependent on the basicity of this group; and (iii) the accessibility of the thiolate group to the solvent. It is then clear that protein thiol groups are excellent reporters of their protein environment and because of that we have used the reactivity of the BADH essential thiol group, measured as the rate constant of the enzyme inactivation by chemical modification, to assess ligand-induced conformational changes that might be important in these enzymes activity.

By means of chemical modification with the specific thiol reagent methyl methanethiosulphonate (MMTS), it has been recently found that the reactivity and/or accessibility of the thiol group of the essential cysteine residue of *P. aeruginosa* BADH changed upon binding of the coenzymes [19]. Here we report that in both enzymes, at physiological or near physiological pH values, all binary enzyme-ligand complexes undergo similar changes, which might be important for both proper enzyme function and protection against oxidation.

2. Materials and methods

2.1. Enzyme purification and assay

BADH was purified to homogeneity from *P. aeruginosa* PAO1 strain and from amaranth leaves by the rapid purification procedures reported earlier [5,13]. In the case of the plant enzyme a final step of purification through a Mono Q HR5 column (Pharmacia) connected to a HPLC system (Waters) was included. The measurement of the

dehydrogenase activity was performed spectrophotometrically as reported elsewhere [5,13].

2.2. Chemical modification

Chemical modification of BADH by thiol-modifying reagents was carried out in the absence or presence of ligands at 30 °C, under pseudofirst-order conditions in the absence of low molecular weight thiol compounds and under anaerobic conditions. *P. aeruginosa* BADH, 0.5 μM monomer, was modified with 5 μM MMTS, while 4 mM iodoacetamide (IAM) was used with the amaranth enzyme, 2.6 μM monomer. The inactivation medium consisted of MES-HEPES-CHES buffer, 30 mM each, containing 1 mM EDTA, 25 mM KCl, and 600 mM trehalose (*Pseudomonas* enzyme) or 10% (v/v) glycerol (amaranth enzyme). The effect of ligands on BADH inactivation was investigated by preincubating the enzymes with the coenzymes or betaine aldehyde for 1 or 30 min before addition of the modifying reagent. At appropriate intervals, aliquots of the reaction mixture were removed for the measurement of enzyme activity by the standard assay. First-order analysis of the time courses of inactivation were performed by nonlinear fitting, using single or double exponential decay equations for monophasic or biphasic inactivation, respectively.

3. Results and discussion

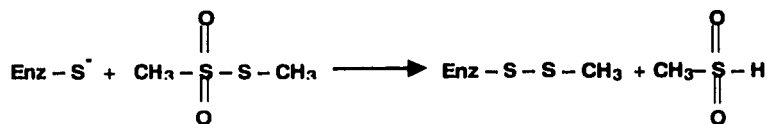
3.1. Reactivity of the catalytic thiol

The reactivity of the catalytic thiol was measured at physiological or near physiological pH values, 7.0 and 8.0 for the *Pseudomonas* and amaranth enzymes, respectively, using as specific thiol modifying reagents MMTS for the bacterial and IAM for the plant enzyme. At pH 8.0, the pH value prevalent in chloroplast under illumination [20], chemical modification of the catalytic thiolate by MMTS was too rapid for the kinetics of inactivation to be observed by standard procedures. Therefore we used IAM, a less reactive thiol reagent, which, as MMTS, reacts only with the thiolate form of the sulfhydryl group (Scheme 1).

The inactivation kinetics of both BADHs were biphasic (Figs. 1 and 2). About 20–30% of the total enzyme activity was lost during the first rapid phase, which exhibited a pseudofirst-order rate constant about 10 times higher than that of the second, slow phase (Tables 1 and 2). Biphasic kinetics of inactivation of the amaranth enzyme have been also observed using other thiol specific reagents [21], but those of the bacterial enzyme were not detected in the absence of ligands in a previous study [19] for reasons not yet fully understood. Several mechanisms may be responsible for the existence of two inactivation rates. Because both BADHs are oligomeric, tetrameric that from *P. aeruginosa* [22] and dimeric that from amaranth [5], negative cooperativity between the subunits of an enzyme molecule could account for a biphasic inactivation process. The extent of both phases, however, rules out this possibility, at least in the case of the dimeric amaranth BADH. If this were the case the amplitude of the fast phase would be 50%, or higher if the chemical modification were faster than the conformational change underlying the negative cooperative between the two sites. Rather, this finding suggests that, under the experimental conditions of inactivation, *P. aeruginosa* and amaranth BADHs exist as two forms greatly differing in the reactivity and/or accessibility of their cysteine(s) susceptible(s) to chemical modification. Since both enzymes appear to be highly homogeneous in SDS-PAGE, and there is no evidence as yet of isoenzymes, these two forms may represent different enzyme conformers. Their relative concentration would be given by the amplitude of the two phases. The two putative forms might be present *in vivo*, or be the result of some unknown and unwanted modification during the extraction or purification procedures.

3.2. Coenzyme-induced conformational changes affecting reactivity and/or solvent accessibility of the essential thiolate

Active site rearrangements induced in both BADHs by binding of their ligands were assessed by determining the changes in the rates of inactivation by the specific thiol reagents after preincubation of the enzymes with the ligands for 1 and 30



**Methyl methanethiosulphonate
(MMTS)**



**Iodoacetamide
(IAM)**

Scheme 1. Reaction of MMTS and IAM with protein thiols.

min. We have used small thiol reagents in order to avoid as much as possible steric effects, and high concentrations of ligands relative to their K_m values to assure saturating or almost saturating conditions.

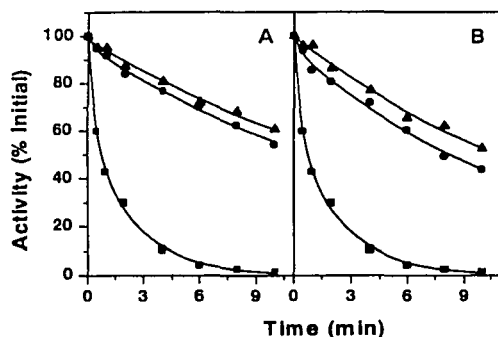


Fig. 1. Effect of coenzymes on the reactivity of the catalytic thiolate of *P. aeruginosa* BADH. The enzyme, 0.5 μM monomers, was inactivated with 5 μM MMTS in the absence (■) or presence of 6 mM NAD^+ (A) or 6 mM NADH (B), which have been added to the enzyme 1 (●) and 30 (▲) min prior to the MMTS treatment. The buffer used was 30 mM MES-HEPES-CHES, pH 8.0, containing 1 mM EDTA, 25 mM KCl and 600 mM trehalose. The lines are the best fit of the inactivation data to the equation for a single or double exponential decay by nonlinear regression.

Preincubation of *P. aeruginosa* BADH for 1 min with either 6 mM NAD^+ or 6 mM NADH, prior to the chemical modification by MMTS, resulted in an important reduction in the amplitude of the first rapid phase of inactivation, which completely

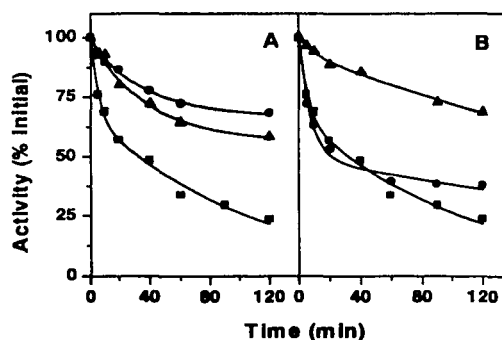


Fig. 2. Effect of coenzymes on the reactivity of the catalytic thiolate of amaranth BADH. The enzyme, 2.6 μM monomers, was inactivated with 4 mM IAM in the absence (■) or presence of 4 mM NAD^+ (A) or 4 mM NADH (B), which have been added to the enzyme 1 (●) and 30 (▲) min prior to the IAM treatment. The buffer used was 30 mM MES-HEPES-CHES, pH 8.0, containing 1 mM EDTA, 25 mM KCl and 10% (v:v) glycerol. The lines are the best fit of the inactivation data to the equation for a double exponential decay by nonlinear regression.

Table 1
Effect of ligands on the reactivity^a of the catalytic thiolate of *P. aeruginosa* BADH

Ligand ^b	$k_{\text{obs}}^{\text{c}}$ (min ⁻¹)	$k_{\text{obs}}^{\text{c}}$ (min ⁻¹)	Amplitude ₁ ^c (%)	Amplitude ₂ ^c (%)
None	3.5 ± 1.2	0.44 ± 0.00	32.9 ± 5.7	67.1 ± 5.5
NAD ⁺ (1 min)	2.4 ^d	0.05 ± 0.0	4.7 ± 1.6	95.4 ± 1.0
NAD ⁺ (30 min)	–	0.05 ± 0.0	–	98.4 ± 0.9
NADH (1 min)	2.4 ^d	0.08 ± 0.0	6.1 ± 2.6	94.1 ± 1.6
NADH (30 min)	–	0.06 ± 0.0	–	99.8 ± 1.1
BA (1 min)	2.4 ^d	0.26 ± 0.2	17.5 ± 4.8	82.5 ± 4.0
BA (30 min)	–	0.21 ± 0.0	–	101.5 ± 1.3

^a Reactivity towards 5 μM MMTS under the conditions described in Section 2.

^b Ligands concentration was 6 mM for the coenzymes and 10 mM for betaine aldehyde. Within parenthesis are given the periods of preincubation of the enzyme with the ligand prior to the chemical modification.

^c Values ± S.E. were estimated by a fit of the data shown in Fig. 1 and Fig. 3A to the equation for a single or double exponential decay.

^d These values were fixed during the fitting procedure. BA, betaine aldehyde.

disappeared after a 30 min preincubation period when only the second phase was observed (Fig. 1). The rate constant of the first phase was not significantly affected by this treatment, while that of the second phase was decreased 5–10 times in the presence of the coenzymes (Table 1). Both effects of the preincubation with the nucleotides, i.e. monophasic inactivation kinetics and a very slow rate constant, result in an effective protection of the bacterial enzyme against inactivation by MMTS-modification of its catalytic thiolate. This result contrasts with the NAD⁺ and NADH-elicited increase in enzyme inactivation by a bulkier reagent, disulfiram, observed in studies in which the ligand and the modifying reagent were added simultaneously to the enzyme [21]. It is likely, then, that binding of the coenzyme brings about a rapid conformational change leading to a higher exposure of the catalytic thiolate to the solvent, even though its reactivity is very much diminished.

In the case of the amaranth BADH, preincubation with the oxidized or reduced coenzymes had opposite effects on the kinetics of inactivation. Preincubation with 4 mM NAD⁺ progressively increased the extent of the first phase of inactivation, which exhibited a rate constant 10 times smaller than in the absence of the dinucleotide. The rate constant of the second phase was reduced to zero; in fact, negative values were obtained during the fitting procedure, so we fixed this value to zero

(Fig. 2A and Table 2). Thus, NAD⁺ afforded the amaranth enzyme a higher degree of protection against inactivation at short times after its binding than at longer times. In contrast, NADH protected the enzyme against inactivation mainly after prolonged preincubation (Fig. 2B and Table 2). The more important changes elicited by 4 mM NADH in amaranth BADH inactivation by IAM were an increase in the amplitude of the first rapid phase after 1 min of preincubation, followed by an important decrease when the reaction of chemical modification of the enzyme was initiated after a longer preincubation period with the coenzyme (30 min). The rate constant of the first phase was decreased by preincubation with NADH, although to a lesser extent than by preincubation with NAD⁺, while that of the second phase was small but clearly distinct from zero.

3.3. Betaine aldehyde-induced conformational changes affecting reactivity and/or solvent accessibility of the essential thiolate

The kinetics of *P. aeruginosa* BADH inactivation in the presence of betaine aldehyde were also biphasic after short times of preincubation, as in the case of the coenzymes, but they become monophasic after a 30 min preincubation period, with a pseudofirst-order rate constant characteristic of the second slow phase (Fig. 3A and Table 1). This rate constant was about 2 times lower than

Table 2
Effect of ligands on the reactivity^a of the catalytic thiolate of *A. hypochondriacus* BADH

Ligand ^b	$k_{obs1} (\times 10^{-3})^c (\text{min}^{-1})$	$k_{obs2} (\times 10^{-3})^c (\text{min}^{-1})$	Amplitude ₁ ^c (%)	Amplitude ₂ ^c (%)
None	294 ± 13	12 ± 1	22.0 ± 4.3	78.0 ± 3.8
NAD ⁺ (1 min)	28 ± 3	0 ^d	32.3 ± 1.3	66.8 ± 1.2
NAD ⁺ (30 min)	27 ± 4	0 ^d	43.5 ± 2.6	56.5 ± 2.6
NADH (1 min)	130 ± 32	2 ± 1	49.1 ± 6.2	49.9 ± 5.8
NADH (30 min)	95 ± 72	2 ± 0	6.1 ± 2.4	94.0 ± 2.3
BA (1 min)	44 ± 31	2 ± 2	30.2 ± 16.2	70.3 ± 17.0
BA (30 min)	37 ± 36	3 ± 1	14.4 ± 12.1	84.8 ± 12.4

^a Reactivity towards 4 mM IAM under the conditions described in Section 2.

^b Ligands concentration was 4 mM in all cases. Within parenthesis are given the periods of preincubation of the enzyme with the ligand prior to the chemical modification.

^c Values ± S.E. were estimated by a fit of the data shown in Figs. 2 and 3B to the equation for a single or double exponential decay.

^d These values were fixed during the fitting procedure. BA, betaine aldehyde.

that obtained in the absence of ligands but 3 times higher than that obtained after preincubation with the coenzymes. Surprisingly, betaine aldehyde afforded less protection against inactivation by chemical modification of the essential cysteine that the coenzymes, suggesting that its binding to the free enzyme is mostly nonproductive and does not involve interaction with the catalytic thiolate. A similar conclusion has been reached elsewhere to

explain the increased enzyme inactivation by disulfiram in the presence of betaine aldehyde [21]. Alternatively, enzyme inactivation in the presence of the aldehyde might be caused by modification of a cysteine residue other than the catalytic one, but whose modification blocks the access to the active site or destabilizes the active enzyme conformation.

Betaine aldehyde, at a concentration of 4 mM, increased the extent of the fast phase of inactivation of the amaranth BADH when the inactivation kinetics were determined 1 min after mixing the enzyme and the aldehyde. After a 30 min preincubation period, the extent of this phase was importantly decreased as compared to that exhibited by the enzyme in the absence of ligands (Fig. 3B and Table 2). The rate constants of both phases were about 3 times smaller in the presence of the aldehyde than in its absence and their values did not change with the length of the preincubation period (Table 2). Although the transitory increase in the fast rapid phase of inactivation of amaranth BADH elicited by betaine aldehyde and NADH is not yet understood, eventually both ligands brought about an enzyme conformation more resistant to inactivation by chemical modification. Again, betaine aldehyde did not afford the total protection expected from its interaction with the catalytic thiolate to form the thiohemiacetal during the first step of the catalytic cycle. Thus, as discussed above for the bacterial enzyme, it seems that betaine aldehyde in the absence of coenzyme

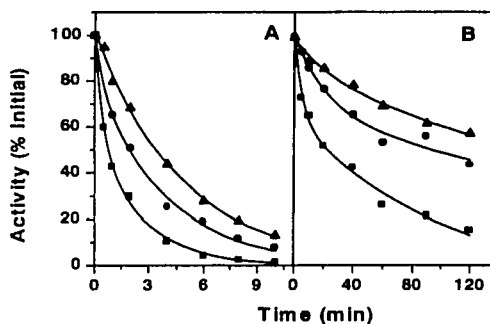


Fig. 3. Effect of betaine aldehyde on the reactivity of the catalytic thiolate of BADH. *P. aeruginosa* BADH (A) or amaranth BADH (B) were inactivated under the conditions described in Fig. 1 or 2, respectively, in the absence (■) or presence of betaine aldehyde, which has been added to the enzyme 1 (●) and 30 (▲) min prior to the chemical modification. The lines are the best fit of the inactivation data to the equation for a single or double exponential decay by nonlinear regression.

binds to the enzyme in a nonproductive manner that does not prevent chemical modification of the thiolate. This conclusion agrees with the ordered kinetic mechanism of amaranth BADH in which betaine aldehyde is the second substrate [5], indicating that it does not productively bind to the free enzyme. However, high concentrations of the aldehyde produce partial substrate inhibition, which has been shown by classical kinetic studies to be caused by the formation of a ternary enzyme-NADH-betaine aldehyde complex, from which the coenzyme can be released giving rise to an alternative, slower, reaction route [23]. According to this kinetic mechanism, betaine aldehyde at high concentration would be able to bind to the same enzyme form as NADH, and therefore produce similar effects on the enzyme.

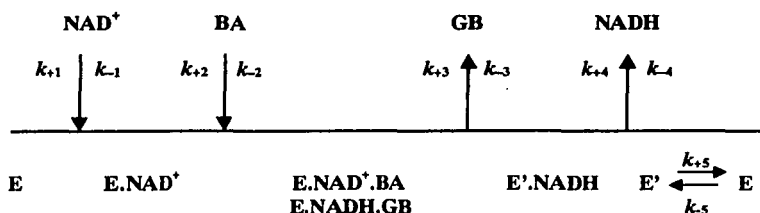
3.4. General discussion

It is interesting that in both BADHs the extent of the two phases of inactivation observed after preincubation with any ligand changed not only with respect to that observed in the enzyme in the absence of ligands but also as the preincubation period increased. On the contrary, the rate constants, although different to those observed in the free enzyme, remained the same regardless of the length of the preincubation period. These findings suggest that the two putative enzyme conformers, which we postulate give rise to the biphasic inactivation kinetics because of their differing reactivity towards thiol modifying reagent, are at equilibrium and that the ligands slowly shift this equilibrium towards the conformer to which they preferentially bind. In the case of the *P. aeruginosa* BADH, both the coenzymes and the aldehyde appear to bind to the same form, the one with the less reactive thiolate, while in the case of the amaranth enzyme NAD⁺ seems to bind to a different form than NADH and betaine aldehyde. The different behavior of both coenzymes might be related to the proposed iso nature of the kinetic mechanism of amaranth BADH [14] depicted in Scheme 2. According to this mechanism, the free enzyme exists in two inter-convertible forms, one that binds and releases NADH, and another that binds NAD⁺. It may be speculated that both

forms differ in the reactivity of their thiolate and/or in their response to the binding of the coenzyme. The equilibrium constant of the free enzyme isomerization step is as yet unknown so the observed reactivity of the free enzyme cannot be assigned to a particular isoform. It is conceivable, however, that under the high concentrations of coenzyme used in these experiments the isoform to which a particular coenzyme binds and stabilizes would predominate in the holoenzyme. Thus, if our speculation is correct, about 25% of the free enzyme would be in the form stabilized by NAD⁺ and 75% in that stabilized by NADH or high betaine aldehyde concentrations. Under catalytic conditions the isomerization step is, at least partially, rate-limiting, otherwise it would have not been observed in steady-state kinetics. Under non-catalytic conditions, as those of the experiments described here, this isomerization step might be much slower. Indeed, if it is the one we are observing in the present experiments, our results indicate that reaching the new equilibrium position after binding the ligands requires more than 30 min, a huge amount of time compared with that of a single catalytic turnover.

3.5. Possible physiological implications of the ligand-induced conformational changes

The reaction catalyzed by *Pseudomonas* and amaranth BADHs involves the nucleophilic attack of a catalytic cysteinyl residue on the aldehyde substrate. Possessing such a highly reactive thiol group poses a great risk for an enzyme that works under aerobic conditions. Our results suggest that BADH has evolved a mechanism, involving either ligand-induced conformational changes or a ligand-induced shift of a preexisting equilibrium between two enzyme conformers, which confers protection against a possible enzyme inactivation by oxidation of the catalytic thiolate by environmental oxygen and/or reactive oxygen species. Thus, at physiological pH values, the free enzyme seems to exist in two conformations differing in the reactivity and/or accessibility of their thiolate, being the less reactive the most abundant one. If only one substrate is bound, and thus no reaction takes place, the equilibrium is shifted towards the



Scheme 2. Iso ordered bi-bimolecular mechanism of amaranth BADH. BA, betaine aldehyde. GB, glycine betaine.

unreactive, 'protected' form. Our findings indicate, however, that this proposed mechanism of protection against oxidation does not apply for the enzyme-NAD⁺ complex of the amaranth BADH. This complex is, likely, the most abundant enzyme form in vivo, given the intrachloroplast levels of NAD⁺, which are 10 times higher than those of NADH [24], and the relative affinity of the enzyme for their ligands [14,25]. In the short term, the lower reactivity or accessibility of the thiolate in this complex would be important for protection against inactivation by oxidation, but if the holoenzyme remains inactive for a longer period, due for instance to a drop in the levels of the substrate betaine aldehyde once the stressful conditions are over, an increased oxidation would be expected. The modification of the enzyme by oxidation might be an important signal for degradation of the BADH protein. In this way, amaranth BADH could adjust its activity to the availability of the substrate.

In summary, we propose that the ligand-induced conformational changes in BADH might be important not only for proper enzyme function but also for protection against oxidation.

Acknowledgements

This work was supported by the Dirección General de Apoyo al Personal Académico, UNAM (DGAPA-IN 221001 grant). L.G.S. is a recipient of a scholarship from Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM, and L.C.D. from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

References

- [1] P. Falkenberg, A.R. Strom, Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1034 (1990) 253–259.
- [2] J. Boch, B. Kempf, E. Bremer, Osmoregulation in *Bacillus subtilis*: synthesis of the osmoprotectant glycine betaine from exogenous provided choline, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 5364–5371.
- [3] N. Mori, B. Kawakami, K. Hyakutome, Y. Tani, H. Yamada, Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpus didymum* M-1, *Agric. Biol. Chem.* 44 (1980) 3015–3016.
- [4] E.A. Weretilnyk, A.D. Hanson, Betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves. Purification, in vivo translation of the mRNA, and regulation by salinity, *Arch. Biochem. Biophys.* 271 (1989) 56–63.
- [5] E.M. Valenzuela-Soto, R.A. Muñoz-Clares, Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase extracted from detached leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. subjected to water deficit, *J. Plant Physiol.* 143 (1994) 145–152.
- [6] A.M. Guzmán-Partida, E.M. Valenzuela-Soto, Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties, *Comp. Biochem. Biophys. Part B* 119 (1998) 485–491.
- [7] T. Arakawa, S.N. Timasheff, The stabilization of proteins by osmolytes, *Biophys. J.* 47 (1985) 411–414.
- [8] T. Nagasawa, Y. Kawabata, Y. Tani, K. Ogata, Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* A-16, *Agric. Biol. Chem.* 40 (1976) 1743–1749.
- [9] R. Velasco-García, L. González-Segura, R.A. Muñoz-Clares, Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem. J.* 352 (2000) 675–683.
- [10] J.P. Kilbourne, Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis, *Lancet* i (1978) 334.
- [11] S.R. Pepsin, O.A. Candia, Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22 (1982) 651–659.

- [12] J.R. Wright, J.A. Clements, Metabolism and turnover of lung surfactant, *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 (1987) 426–444.
- [13] R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, G. Mendoza-Hernández, R.A. Muñoz-Clares, Rapid purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Bacteriol.* 181 (1999) 1292–1300.
- [14] E.M. Valenzuela-Soto, R.A. Muñoz-Clares, Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an iso ordered bi bi steady state mechanism, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 23818–23824 (addition and correction, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 4692).
- [15] J. Legaria, R. Rajsbaum, R.A. Muñoz-Clares, M. Villegas-Sepúlveda, N.J. Simpson, G. Iturriaga, 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 (1998) 69–76.
- [16] J. Hempel, H. Nicholas, R. Lindahl, Aldehyde dehydrogenases: widespread structural and functional diversity within a shared framework, *Protein Sci.* 2 (1993) 1890–1900.
- [17] C.K. Stover, X.Q. Pham, A.L. Erwin, S.D. Mizoguchi, et al., Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature (London)* 406 (2000) 959–964.
- [18] J. Perozich, H. Nicholas, B.C. Wang, R. Lindahl, J. Hempel, Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family, *Protein Sci.* 8 (1999) 137–146.
- [19] L. González-Segura, R. Velasco-García, R.A. Muñoz-Clares, Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem. J.* 361 (2002) 577–585.
- [20] M. Hauser, H. Eichelmann, V. Oja, U. Heber, A. Laisk, Stimulation by light of rapid pH regulation in the chloroplast stroma in vivo as indicated by CO₂ solubilization in leaves, *Plant Physiol.* 108 (1995) 1059–1066.
- [21] R. Velasco-García, V.M. Chacón-Aguilar, D. Hervert-Hernández, R.A. Muñoz-Clares, Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves by disulfiram, *Chem. Biol. Interact.*, this special issue.
- [22] E. Valenzuela-Soto, R. Velasco-García, C. Mújica-Jiménez, L. Gaviria-González, R.A. Muñoz-Clares, Monovalent cations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidneys and amaranth leaves, *Chem. Biol. Interact.*, this special issue.
- [23] M. Vojtechova, R. Rodríguez-Sotres, E.M. Valenzuela-Soto, R.A. Muñoz-Clares, Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L., *Biochim. Biophys. Acta* 1341 (1997) 49–57.
- [24] P. Raymond, X. Gidrol, C. Salon, A. Pradet, Control involving adenine and pyridine nucleotides, in: *The Biochemistry of Plants*, vol. 11, Academic Press, New York, 1987, pp. 129–176.
- [25] R.A. Muñoz-Clares, C. Mújica-Jiménez, Complexes of NADH with betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of the plant *Amaranthus hypochondriacus* L., *Chem. Biol. Interact.* 130–132 (2001) 71–80.

VII. 3. PAPEL DE LAS CISTEÍNAS NO ESENCIALES DE LA BADH DE *P. aeruginosa*

La mutagénesis sitio-dirigida ha sido de gran utilidad en esta parte de la investigación, ya que nos ha permitido complementar e interpretar los resultados que habíamos obtenido previamente en experimentos de modificación química durante la realización de mi tesis de maestría y conocer el papel de las cisteínas no esenciales.

De los tres residuos de cisteínas que posee la BADH y que no son esenciales para la actividad, la Cys439 (numeración de *P. aeruginosa*) sólo se encuentra conservada en algunas BADHs que son tetraméricas como las de animales y bacterias. En el caso de plantas, en esta posición se encuentran residuos de aminoácidos apolares como la Val, Ile y Leu. En las ALDHs la Cys439 sólo se encuentra conservada en un 11.6%, ya que, al igual que ocurre en las BADHs, en esta posición se encuentra mayoritariamente una valina (77.2%).

En lo que se refiere a las Cys377 y Cys353, esta última se encuentra conservada en un 58.5% en las BADHs y 44.8% en las ALDHs, mientras que, la C377 sólo se conserva en un 36.5 y 12.4% en las BADHs y ALDHs, respectivamente. La C353 parece ser la más conservada de las tres cisteínas no esenciales tanto en las BADHs como en las ALDHs.

Con el propósito de investigar si las cisteínas no esenciales juegan algún papel en la actividad y/o estabilidad de nuestra enzima se obtuvieron las mutantes sencillas C353A, C377A, C439A y C439S utilizando la técnica de mutagénesis sitio-dirigida. Cada una de las mutantes fue expresada en *E. coli* en forma activa, lo que indica que ninguna de estas cisteínas es crítica para que ocurra el plegamiento correcto de la proteína. Todas se purificaron siguiendo el mismo procedimiento que el usado para la enzima silvestre. En breve, se somete al extracto libre de células a una cromatografía de intercambio iónico usando sefarosa de flujo rápido (Q-fast Sepharose, Pharmacia, Uppsala, Sweden) y posteriormente las fracciones con actividad de BADH se someten a una cromatografía de afinidad 2'5'ADP-sefarosa (Pharmacia, Uppsala, Sweden). Las enzimas mutantes se unen a la columna de afinidad y se eluyen de ésta con el mismo gradiente de pH que la enzima silvestre, lo cual nos indica que las cisteínas no están participando en el proceso de unión

del nucleótido. Sin embargo, encontramos que la actividad de las mutantes C439A y C439S se aumenta entre 3 y 11 veces cuando estas enzimas son eluidas de la cromatografía de intercambio iónico (Tabla V) con una concentración de KCl 250 mM. Aunado a esto, encontramos que estas dos mutantes disminuyen su actividad durante su almacenamiento como preparación de enzima pura en un amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 6.9, que contiene 20% sacarosa (p/v), EDTA 0.1 mM, β -mercaptoetanol 10 mM y KCl 25 mM. Al modificar este amortiguador aumentando la concentración de KCl a 250 mM, encontramos que mantenían su actividad durante su almacenamiento. Estos resultados nos indican que las mutantes de la Cys439 requieren de una mayor concentración de potasio o de una fuerza iónica mayor para mantener su conformación activa.

VII.3.1. Papel en la catálisis

Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos para cada una de las mutantes son muy parecidos a los de la enzima silvestre, como se puede observar en la Tabla I del Artículo III, lo que nos indica que ninguna de las cisteínas está involucrada en catálisis o en la unión de los sustratos.

VII.3.2. Papel en la regulación de la actividad

Los resultados de la modificación química por compuestos comúnmente usados para reaccionar con residuos de cisteínas vecinales obtenidos durante mi tesis de maestría, nos hicieron pensar en la existencia de una pareja de cisteínas vecinales en la BADH de *P. aeruginosa*. Por ejemplo, el tratamiento de la enzima con un reactivo que se ha usado repetidamente como específico para ditiolos, el arsenito-2, 3-dimercaptopropanol (As-BAL), producía una inactivación parcial reversible de la enzima. Una de las cisteínas de la pareja parecía ser la esencial, puesto que los sustratos protegían totalmente frente a esta inactivación. De existir estas cisteínas vecinales podrían estar jugando algún papel en la regulación de la actividad de la enzima, como es frecuentemente el caso de estos ditiolos,

por lo que en este trabajo creímos interesante investigar más a fondo esta posibilidad por medio de mutagénesis sitio-dirigida.

Tabla V. Purificación^a de las enzimas BADH silvestre y de las mutantes de *P. aeruginosa*

Paso de purificación	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento (%)
<u>Enzima silvestre</u>				
Extracto crudo	769	23513	30.5	100
Sefarosa-Q de flujo rápido	369	21404	58.0	91
2', 5'-ADP-sefarosa	69	13526	196.0	57
<u>C353A</u>				
Extracto crudo	435	6500	14.9	100
Sefarosa-Q de flujo rápido	210	6921	32.9	106
2', 5'-ADP-sefarosa	29	4008	138.2	61
<u>C377A^b</u>				
Extracto crudo	600	15763	26.2	100
sefarosa-Q de flujo rápido	288	11847	41.1	75
2', 5'-ADP-sefarosa	43	7119	165.5	45
<u>C439A</u>				
Extracto crudo	312	6608	21.2	100
Sefarosa-Q de flujo rápido	169	17748	105.0	268
2', 5'-ADP-sefarosa	34	6440	189.4	97
<u>C439S</u>				
Extracto crudo	374	464	1.2	100
Sefarosa-Q de flujo rápido	153	5168	33.8	1114
2', 5'-ADP-sefarosa	24	2443	101.8	526

^a Resultado de una purificación típica partiendo de 2.4 litros de cultivo bacteriano y usando KCl 250 mM en el amortiguador de la cromatografía de afinidad.

^b Resultado de una purificación usando KCl 25 mM en todos los amortiguadores.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO VALE
 DE LA BIBLIOTECA

Al tratar a las enzimas mutantes de las cisteínas no esenciales, C353A, C377A y C439A, con As-BAL encontramos que todas ellas seguían inactivándose y presentaban la misma cinética de inactivación que la enzima silvestre (Fig. 17). La actividad en todas las enzimas disminuyó hasta alcanzar una meseta después de 15 min de incubación, quedándose con una actividad residual entre el 65 y el 75% de la inicial. El ajuste de los datos experimentales a la ecuación de una inactivación reversible de primer orden, descrita en Materiales y Métodos, permitió estimar los siguientes valores para la constante de velocidad de inactivación aparente: $0.61 \pm 0.13 \text{ min}^{-1}$ para la enzima silvestre, $0.85 \pm 0.14 \text{ min}^{-1}$ para la mutante C353A, $1.83 \pm 0.50 \text{ min}^{-1}$ para la C377A y $1.12 \pm 0.18 \text{ min}^{-1}$ para la C439A.

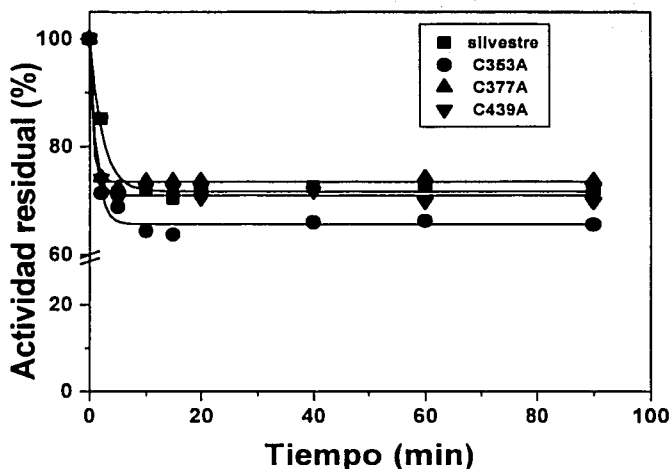


Figura 17. Inactivación de la enzima silvestre y las enzimas mutantes de la BADH de *P. aeruginosa* por As-BAL. Las enzimas ($0.14 \mu\text{M}$) se incubaron con As-BAL $250 \mu\text{M}$. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de las enzimas. Los datos experimentales de inactivación se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación de una inactivación reversible de primer orden, descrita en Materiales y Métodos.

Estos resultados nos indicaron que no existe una pareja de cisteínas vecinales en la BADH y que los reactivos para ditioles como el Cu(OP)_2 o el As-BAL que inactivan a nuestra enzima no son tan específicos como se ha estado manejando anteriormente. Además, con la ayuda del modelo tridimensional de la BADH de *P. aeruginosa* (Figura 8 del Artículo III), encontramos que las cisteínas se encuentran a una distancia de 15 a 20 Å entre ellas, lo cual no es compatible con la formación de un puente disulfuro, cuya distancia de enlace es de 1.5 a 2 Å.

Otra sugerencia derivada de los experimentos realizados durante la maestría era la existencia de una tercera cisteína, no esencial, reactiva sólo en presencia de los sustratos, que al ser modificada evitaba la posterior modificación de la cisteína esencial. Esta conclusión se basaba en que después del tratamiento de la enzima con NEM en presencia de los ligandos, para proteger a la cisteína esencial, un tratamiento posterior con MMTS, ahora en ausencia de los ligandos, producía una inactivación parcial con una constante de inactivación menor que la encontrada cuando la enzima se inactivaba con MMTS sin el tratamiento previo arriba mencionado. Cinéticas similares se observaron cuando la modificación con MMTS se hacía en presencia de los ligandos. Al tratar a las enzimas mutadas con MMTS en ausencia de ligandos se encontró en todos los casos una cinética de inactivación monofásica (Fig. 18) con constantes de inactivación de pseudo-primer orden muy parecidas a las de la enzima silvestre. Los valores para estas constantes de inactivación de pseudo-primer fueron: $3.20 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$ para la enzima silvestre, $5.44 \pm 0.05 \text{ min}^{-1}$ para la mutante C353A, $4.88 \pm 0.01 \text{ min}^{-1}$ para la C377A y $2.55 \pm 0.23 \text{ min}^{-1}$ para la C439S. En presencia del NADH, las enzimas mutadas en las cisteínas no esenciales presentaron la misma reactividad de la cisteína catalítica hacia MMTS que la enzima silvestre con una cinética de inactivación bifásica (Fig. 19), a excepción de la C377A que presentó una cinética de inactivación monofásica. El valor de la constante de inactivación de la primera fase fue de 2.24 min^{-1} para las enzimas silvestre, C353A y C439A, mientras que el de la constante de inactivación de la segunda fase fue de 0.31 min^{-1} para la enzima silvestre, de 0.41 min^{-1} para la mutante C353A y de 0.83 min^{-1} para la mutante C439S. La mutante C377A se inactivó con una constante de inactivación de pseudo-primer orden de 1.20 min^{-1} . Estos resultados nos indican que la disminución de reactividad de la cisteína esencial que

encontramos en el trabajo de tesis de maestría no se debe al efecto protector de una cisteína no esencial, sino que muy probablemente sea el resultado del cambio conformacional o del desplazamiento del equilibrio entre dos formas de la enzima producidos por la preincubación de ésta en presencia de los ligandos, como se discutió anteriormente.

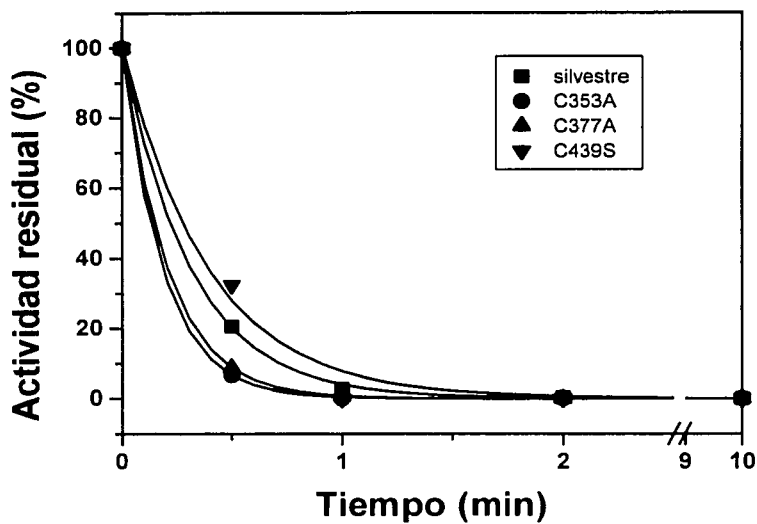
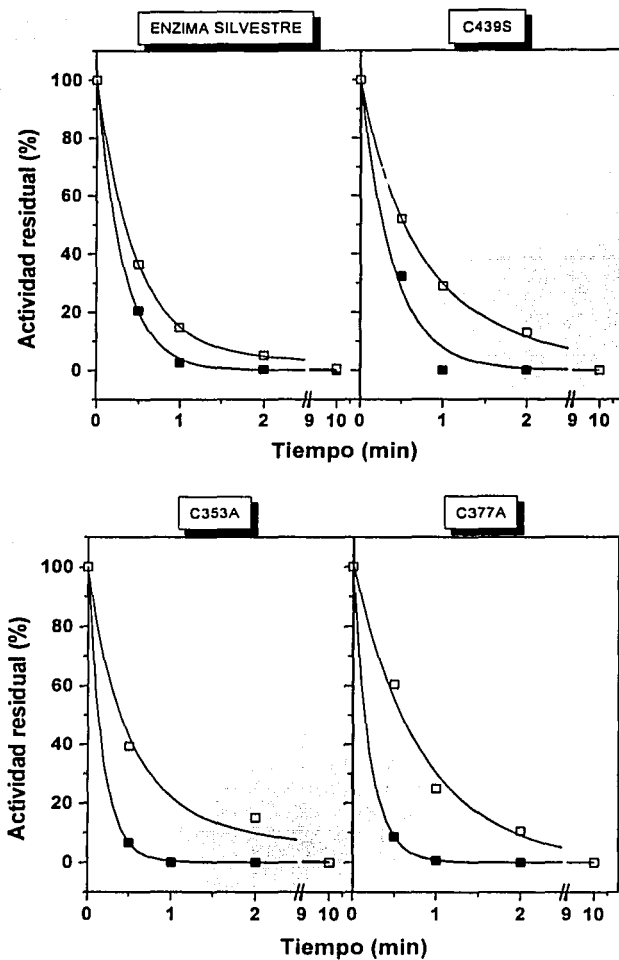


Figura 18. Inactivación de las enzimas silvestre y mutantes de BADH de *P. aeruginosa* por MMTS. Las enzimas ($0.5 \mu\text{M}$) fueron dializadas en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM , $\text{pH } 8.0$, con EDTA 1 mM , sacarosa 20% y KCl 250 mM , e incubadas con MMTS $5 \mu\text{M}$. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de las enzimas. Los datos experimentales de inactivación se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación de un decaimiento exponencial sencillo.



TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Figura 19. Efecto del NADH sobre la inactivación de la enzima silvestre y la mutante C439S de BADH de *P. aeruginosa* por MMTS. Las enzimas (0.5 μ M) fueron dializadas en un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 8.0, con EDTA 1 mM, sacarosa 20% y KCl 250 mM, e incubadas con MMTS 5 μ M en ausencia (■) o en presencia (□) de 6 mM de NADH, el cual fue agregado a la enzima 30 min antes del tratamiento con MMTS. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de las enzimas. Los datos experimentales de inactivación en ausencia del dinucleótido se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación de un decaimiento exponencial sencillo y los obtenidos en presencia del dinucleótido a la de un doble decaimiento exponencial.

VII.3.3. Papel en la estabilidad

Al sobreexpresar a las enzimas mutantes de BADH de *P. aeruginosa* a una temperatura de 37 °C, todas ellas se obtuvieron activas con excepción de la mutante C439S, que no mostró actividad. La electroforesis en geles de acrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de esta mutante sobreexpresada a 37 °C nos mostró que parte de la enzima se encontraba formando cuerpos de inclusión y otra parte se encontraba en el sobrenadante de forma inactiva (no mostrada). Sólo cuando se sobreexpresó a 28 °C se pudo obtener enzima activa, aunque su actividad específica fue mucho más baja que las otras mutantes o la silvestre (Tabla V). Este resultado indicaba que la mutación en esta posición está afectando el plegamiento correcto o la estabilidad de la enzima plegada.

El dicroísmo circular y la cromatografía de exclusión molecular mostraron que no existen diferencias en cuanto a la estructura secundaria y cuaternaria de las mutantes con respecto a la enzima silvestre (Figuras 2A y C del Artículo III). Sin embargo, en los espectros de fluorescencia intrínseca de los triptofanos sí se observaron diferencias importantes, ya que las mutantes C439A y C439S presentaron un aumento del 35% y 59%, respectivamente, en la intensidad de fluorescencia a la longitud de onda de máxima emisión, con respecto a la enzima silvestre (Figura 2B del Artículo III), indicando de nuevo un papel estructural de este residuo de cisteína. El aumento en la intensidad de fluorescencia en las mutantes C439A y C439S posiblemente se deba a un distanciamiento de los apagadores de fluorescencia del o los triptofanos responsables de la emisión. A este respecto es interesante que existe un residuo triptofano, el W440, inmediato a la C439. Este residuo podría alterar su posición en las mutantes y ser el responsable del aumento en la intensidad de fluorescencia.

Por otra parte, no se observaron diferencias importantes entre la enzima silvestre y las mutantes en el centro espectral de masas (346.62 nm), lo que indica que no hay un cambio en la polaridad del ambiente que rodea al triptofano o triptofanos responsable(s) de la fluorescencia.

Para estudiar a fondo el papel de las cisteínas no esenciales en la estabilidad de la enzima se determinó la sensibilidad de las enzimas silvestre y mutantes a las altas temperaturas,

(Figura 3 del Artículo III), a la dilución (Figura 5A del Artículo III), a la exposición a bajas concentraciones de K^+ (Figura 5B del artículo III) y a agentes desnaturalizantes como la urea (Figura 4 del artículo III). Los resultados mostraron una vez más que las mutantes C439A y C439S son mucho menos estables que la enzima silvestre.

La mutante C439S se inactiva a 37 °C, una temperatura a la que tanto la enzima silvestre como las demás mutantes son estables. Ello explica el que no hubieramos logrado sobreexpresarla activa a esa temperatura. La inactivación sigue un proceso claramente bifásico con una fase inicial rápida seguida de una fase lenta. Este efecto de inactivación se revierte totalmente por la incubación a 20 °C de la enzima previamente inactivada (Fig. 20).

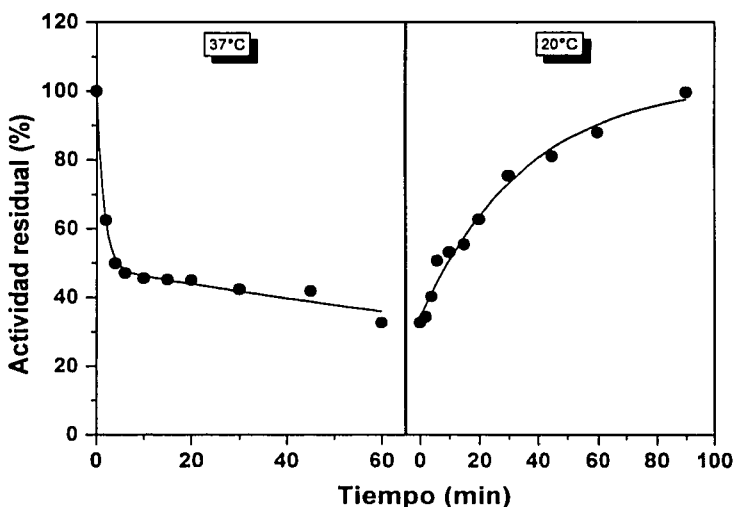


Figura 20. Cinética de inactivación a 37 °C y de reactivación a 20 °C de la mutante C439S de BADH de *P. aeruginosa*. La enzima (1 mg/ml) se incubó a 37 °C en un amortiguador de fosfato de potasio 10 mM, pH 6.9 con β -mercaptoetanol 10 mM, sacarosa 20% (p/v), EDTA 0.1 mM y KCl 250 mM. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de las enzimas. Los datos experimentales de inactivación se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación de un doble decaimiento exponencial y los datos de reactivación a la ecuación de crecimiento exponencial.

La incubación de las enzimas silvestre y mutantes a bajas concentraciones de K^+ (25 mM) mostró que las mutantes de la C439 se inactivan como era de esperarse, ya que los resultados de la purificación usando amortiguadores con bajas concentraciones de K^+ nos sugerían una mayor dependencia de estas dos mutantes de los iones K^+ o de la fuerza iónica. La enzima más inestable fue de nuevo aquella en la que la C439 se había mutado por una serina (Figura 5B del Artículo III).

Como se describió en antecedentes, estudios previos en nuestro grupo de trabajo habían mostrado que la enzima BADH de *P. aeruginosa* tiene un requerimiento estricto por los iones K^+ para mantener su conformación activa (Velasco-García *et al.*, 1999). Posteriormente, se comprobó que en ausencia de K^+ la enzima se disocia a monómeros inactivos, que se reasocian a tetrámeros totalmente activos si se les añade de regreso iones K^+ a una concentración cercana a la fisiológica (Velasco-García *et al.*, 1999; Valenzuela-Soto *et al.*, 2003). Como esperábamos, en ausencia de iones K^+ y en un amortiguador de baja fuerza iónica la enzima C439S se disoció más rápidamente hasta monómeros, en comparación con la C439A, y ésta a su vez más rápidamente que la silvestre (Figura 6 del Artículo III).

Cuando las enzimas se disociaron e inactivaron totalmente en ausencia de potasio y después se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con KCl 250 mM, la enzima silvestre recuperó su estructura tetrámerica en un 80% y su actividad sólo en un 45%, la mutante C439A recuperó su estructura tetrámerica en un 38% y su actividad en un 22% y la C439S sólo recuperó el 14% de su estructura tetramérica y ninguna actividad (Figura 7 del Artículo III). Esto nos muestra la existencia de tetrámeros inactivos en las mutantes de la C439 y en la enzima silvestre. Posiblemente, se podría obtener una mayor recuperación de la estructura tetramérica, así como de la actividad enzimática, si se incubara durante más tiempo a las enzimas en presencia de potasio. Sin embargo, con estos resultados podemos decir que la Cys439 no tiene un papel crítico pero sí importante para obtener la conformación tetrámerica, ya que las mutantes carentes de esta cisteína pueden seguir asociándose de igual forma que la enzima silvestre, aunque con mayor lentitud, y el rendimiento de la enzima asociada correctamente es mucho más bajo.

Igualmente, la incubación de la enzima con urea mostró que las mutantes de la C439 son menos estables que la enzima silvestre, ya que la mutante C439A requirió de 0.42 M y la mutante C439S de 0.57 M de urea para perder la mitad de su actividad, mientras que la enzima silvestre requirió de 1.40 M de urea (Figura 4, Artículo III).

En el modelo tridimensional de la BADH de *P. aeruginosa*, la C439 de una subunidad se encuentra en contacto con el dominio de oligomerización de la otra subunidad en una unidad dimérica y podría estar formando un puente de hidrógeno con la K477, un residuo altamente conservado en las ALDHs y en las BADHs. La distancia entre el átomo de azufre de la C439 y el Nz de la K477 es de 2.83 Å. Sin embargo, contrario a lo que esperábamos basados en nuestro modelo, la mutante C439S, que teóricamente podría reestablecer este puente de hidrógeno con la K477, aunque la distancia entre estos residuos se incrementa 0.3 Å, resultó en una enzima aún más inestable que la C439A. Explorando el modelo, encontramos que en una conformación alternativa existe la posibilidad de que la C439 pudiera participar en una serie de interacciones hidrofóbicas con otros residuos que la rodean, lo que sería congruente con el hecho de que en el caso de la mayoría de las ALDHs, incluidas las BADHs, no existe cisteína en esta posición, sino que usualmente se encuentra un residuo hidrofóbico.

Los resultados de esta segunda parte de la tesis se presentan en el manuscrito " Analysis by chemical modification and site-directed mutagenesis of the role of non-essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. C439 is an important residue for enzyme stability" que será sometido en breve a la revista Biochemistry para su posible publicación.

En resumen, nuestros resultados muestran que la C439 es importante para la estabilidad de la enzima, ya que podría estar formando un puente de hidrógeno con la K477 de la otra subunidad en una unidad dimérica, o bien participar en una serie de interacciones hidrofóbicas entre las subunidades.

VII.3.4. Artículo III.
(Manuscrito en preparación)

"Analysis by chemical modification and site-directed mutagenesis of the role of non-essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. C439 is an important residue for enzyme stability "

Analysis by chemical modification and site-directed mutagenesis of the role of non-essential cysteines in betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. Cys439 is an important residue for enzyme stability.

L. González-Segura^{*†}, R. Velasco-García^{*}, E. Rudiño-Piñera^{††}, and R. A. Muñoz-Clares^{†‡}

^{*}Laboratorio de Osmorregulación, FES Iztacala, ^{††}Depto. de Medicina Molecular y Bioprocesos, IBT, [†]Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., 04510, México.

[‡]Author to whom correspondence should be addressed.

Short title: **Role of Cysteines in BADH from *P. aeruginosa***

Abbreviations used: BADH, betaine aldehyde dehydrogenase; DTT, dithiothreitol; MMTS, methylmethanethiosulphonate.

Abstract

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8) from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is a tetrameric enzyme which contains four cysteine residues per subunit, one of them (C286) being essential for catalysis. In this study, the role of the other three cysteine residues (C353, C377, and C439) in enzyme activity and stability has been investigated by chemical modification and site-directed mutagenesis. All three cysteines were individually mutated to alanines, and C439 also to serine. The mutants were enzymatically active with K_m and k_{cat} values very similar to those of wild-type BADH. The kinetics of inactivation by a thiol specific reagent, in the absence and presence of coenzyme, were also similar in mutants and wild-type BADHs, showing the same reactivity of the catalytic cysteine in all of them. The results of circular dichroism (CD) spectropolarimetry and size exclusion chromatography indicated that there were no major changes in the secondary or quaternary structure of all the mutant enzymes, but protein intrinsic fluorescence showed that there were differences in the tertiary structure between the C349 mutants and the wild-type enzyme. C439 mutants were significantly less stable than the wild-type enzyme and C353 and C377 mutants, as judged by their sensitivity to dilution in high and low K^+ ion concentrations, as well as by thermal and chemical denaturation. A three-dimensional model of *P. aeruginosa* indicated that C353 and C377 are at the protein surface with their sulfur atoms buried, while C439 is in a very well conserved hydrophobic region at the subunit interface between the monomers forming a dimer. Thus, the decreased stability of the mutants C439A and C439S can be explained by the perturbation of interactions between subunits.

INTRODUCTION

In a wide variety of organisms, ranging from bacteria to mammals, betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, betaine aldehyde: NAD oxidoreductase, EC 1.2.1.8) catalyzes the irreversible oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine with the concomitant reduction of NAD(P)^+ to NADP(H) (1-6). In most organisms, glycine betaine is a non-metabolizable osmolite, which accumulates up to high concentrations to prevent water loss and protect cellular components against dehydration or high ionic concentrations (7). But in certain microorganisms, as in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*, glycine betaine is a metabolic intermediate in the catabolism of choline or choline precursors when these compounds are their sole carbon, nitrogen and energy source (8). The BADH catalyzed reaction in these bacteria fulfills an amphibolic function, providing both NADH and NADPH (9). Since choline or choline precursors (10,11) and osmotic stress (12) are present in the tissues infected by the bacteria, it is conceivable that BADH is a key enzyme in the establishment and growth of the pathogen and thus a suitable target for antimicrobial agents. The development of selective antimicrobial agents aimed at this enzyme would require its extensive functional, physicochemical and structural characterization.

Every aldehyde dehydrogenase (ALDH) known to date have an essential Cys residue that is involved in the formation of the reaction intermediate thiohemiacetal with the aldehyde substrate (13). Although this is the only conserved Cys residue in the ALDH superfamily, there are several other Cys residues in these enzymes. In the past, it has been proposed (14-16) that some ALDHs have a thiol vicinal to the essential one. This proposal was made on the basis of the inhibitory effects of arsenite and arsenite-thiol

combinations, which are known to react with enzymes possessing vicinal sulfhydryl groups (17,18). Through their reversible oxidation to a disulfide, vicinal thiols regulate the activity of several enzymes (19) and it is possible that they fulfil a similar role in ALDHs. However, to the best of our knowledge, it has not been investigated so far whether non-catalytic Cys residues have a role on activity, regulation, enzyme stability or folding of any ALDH.

BADH from *P. aeruginosa* is a homotetramer (20) that contains four cysteine residues per subunit and all of them are reduced in the native enzyme (21,22), in accordance with the known three-dimensional crystal structures of ALDHs (23-29, PDB codes 1BXS, 1EZ0, 1EUH, 1AG8, 1QI1, 1AD3, 1CW3 and 1BI9) and one BADH (30, PDB codes 1A4S and 1BPW), which show that the cysteines exist as free thiols. Site-directed mutagenesis of the conserved C286 (*Pseudomonas aeruginosa* numbering) proved that this is the catalytic residue (Velasco-García, R. and Muñoz-Clares, R. A., unpublished work). In a previous paper (22), we reported the characterization of the reactivity of the thiol group of C286, which exists as a thiolate at pH values well below 7.0. The present study was focused on investigating by chemical modification and site-directed mutagenesis the importance of the remaining, non-conserved, three cysteines: C353, C377, and C439. Of the ALDH sequences known to date, these three Cys residues are present in BADHs from *Pseudomonas* genus (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens* and *P. syringae*) (31-33), *E. coli* (34), *Xanthomonas axonopodis* (35), as well as in the yeast *Schizosaccharomyces pombe* (36) and the only three animal BADHs sequenced so far, cod (30), zebrafish (37) and human, which has been named as an ALDH but shares 55% of its amino acid sequence with proved BADHs (38) and has BADH activity (39).

All three cysteines are also present in the trimethylaminobutyraldehyde dehydrogenase from mouse (38), rat (38), and human (38) and C439 is conserved in human ALDH 7 (Table 1). Interestingly, C439 is conserved in BADHs known to be tetrameric, as bacterial and animal enzymes, but it is absent in those known to be dimeric, such as *Bacillus subtilis* and plant BADHs. A non-catalytic residue conserved through evolution from bacteria to fish and mammals might play an important role in enzyme stability or folding.

To date, there are few studies in the literature concerning the factors affecting the stability (23,40) and/or folding (41) of aldehyde dehydrogenases in general and of BADHs in particular. In previous works we have shown that *P. aeruginosa* BADH requires K^+ ions for the maintenance of its tetrameric active conformation (20,21). In the absence of these ions, the enzyme dissociates into inactive monomers. Na^+ cannot replace K^+ in restoring enzyme activity, although it induces re-association of the monomers into inactive tetramers (20). The mechanism of K^+ stabilization and the amino acid residues involved in this process are not yet known.

As part of our efforts to characterize the BADH from *P. aeruginosa*, functionally and structurally, we have investigated the role of the three nonessential Cys residues on enzyme activity and stability by using site-directed mutagenesis and sensitivity to sulfhydryl reagents. We conclude that of these three Cys residues, C439 is important for enzyme stability, most likely due to its location in a very well conserved region at the monomer-monomer interface of dimeric units in ALDH proteins in general.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Betaine aldehyde chloride, glycine betaine (inner salt), NAD(P)⁺, NAD(P)H, DTNB, DTT, and MMTS were obtained from Sigma-Aldrich (Toluca, Mexico). EDTA was from Merck-México (Naucalpan, Mexico). All other chemicals of analytical grade were from standard suppliers.

Site-directed mutagenesis and transformation. Site-directed mutagenesis was performed with the QuikChange™ XL site-directed kit (Stratagene, La Jolla, CA) following the manufacturer's instructions. Plasmid pCALn that contains the full-length *P. aeruginosa* BADH-encoding gene (Velasco-García, R. and Muñoz-Clares, R. A., unpublished work) was used as template. Following subcloning into the XL10-Gold strain, positive transformants were then used to transform the protein expression strain BL21(DE3)pLysS (Stratagene). The oligonucleotides used: 5'CTCCGGCCAGGTCCGGACCAA CGGCACC3' (Cys353A); 5'CGTGTTCACCGATGCGCGCGACGACATG3' (Cys377A); 5'GGAAGCCGGCATCGCGTGGATCAATACC3' (Cys439A) and 5'GGAAGCCGGCATTCCGTGGATCAATACC3' (Cys439S) were prepared by Invitrogen (ACCESOLAB, Mexico). The nucleotides replaced from the wild-type gene are underlined. Mutations were confirmed by DNA sequencing.

Expression and purification of recombinant wild-type and BADH mutants. *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Stratagene) containing the full-length *P. aeruginosa* wild-type BADH-encoding gene or mutated BADH genes were selected for carbenicillin resistance in LB broth containing 50 µg/mL carbenicillin. The medium (2,400 mL) was inoculated with a seed culture (60 mL) and grown overnight in a giratory shaker (150 rpm) at 37 °C

until an O.D. of 0.6 was reached. Then 0.1 mM of isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) was aggregated to the culture. The cells were grown for an additional 4 h period, harvested by centrifugation at $3,000 \times g$ for 10 min and then resuspended in 180 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing 20 mM β -mercaptoethanol. The resuspended cells were desintegrated by sonic oscillation (90 s at 60 W) in a Branson (Danbury, Conn.) sonifier cell disruptor. BADH wild-type and mutants were purified to homogeneity by the rapid purification procedure reported earlier (21), except that the KCl concentration of the buffer used for the last purification step, affinity chromatography, was 10-times higher than the one reported previously (250 mM instead of 25 mM). Pure enzymes were stored at -20°C in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.9, containing 0.1 mM EDTA, 250 mM KCl, 20% (w/v) sucrose and 10 mM β -mercaptoethanol (buffer A). All operations were carried out at 4°C . The purity of the enzymes was assessed by SDS-PAGE in reducing conditions as previously described (21). The enzymes do not contain NAD(P)^{+} or NADP(H) bound as judged by the ratio A_{280}/A_{260} which was ~ 2.0 . Protein concentrations were determined by the Coomassie-G dye binding technique of Bradford (42) using bovine serum albumin as a protein standard.

Western blot analysis. In order to identify the migration of the BADH proteins band after SDS-PAGE of cell free extracts and the integrity of the recombinant wild-type and mutants enzymes, the proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose paper with a BioRad transblot apparatus and Western blot analysis were performed as described (21). 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.

Enzymatic assay and kinetic studies. BADH activity was assayed spectrophotometrically at 30 °C and pH 8.0 by monitoring the absorbance at 340 nm (NADPH formation) as described previously (21). One unit of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 μmol of NADPH per min in our standard assay. Steady-state initial velocity studies were performed at 30 °C as it has been described in a previous study (21). Kinetic data were analyzed by non-linear using a commercial computing program formulated with the algorithm of Marquardt (43). The data set was globally fit to the initial velocity equation for a sequential mechanism

$$v = V[A][B]/(K_{ia}K_b + K_b[A] + K_a[B] + [A][B]) \quad (1),$$

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 (44)).

Chemical modification. Reactions with MMTS at pH 8.0 and 5.5 were carried out in Mes/Hepes/Ches buffer (each at 30 mM), containing 1 mM EDTA, 250 mM KCl and 600 mM Trehalose, in the absence and presence of NADH, as described in an earlier work (21). Activity data were analyzed by non-linear regression calculations using a commercial computing program formulated with the algorithm of Marquardt (43). First-order analysis of time courses of MMTS-induced inactivation were performed with:

$$E_t/E_0 = \exp(-kt) \quad (2)$$

for a monophasic inactivation, or with

$$E_t/E_0 = (E_1/E_0)\exp(-k_1t) + (E_2/E_0)\exp(-k_2t) \quad (3)$$

for biphasic inactivation. E_t and E_0 are, respectively, the activity of the enzyme at times t and 0; k , k_1 and k_2 are the observed pseudo-first-order rate constants and E_1 and E_2 are the amplitudes of each phase.

Circular dichroism. The circular dichroism spectra of the wild-type and the mutant enzymes were obtained by scanning the sample solutions in a 0.2 mm light path cuvette, over the far-UV range (195-260 nm) at 25 °C using a JASCO-715 circular dichroism spectropolarimeter containing a circulating water bath. All proteins at a final concentration of 270 µg/mL were prepared in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.9, containing 250 mM KCl and 0.1 mM DTT. Scans were collected at 1 nm intervals with a band 33 width of 1 nm and a dwell time of 2 s. A total of four scans were collected for each protein solution and the signal was averaged. The data are expressed in terms of molar ellipticity $[\theta]$. The observed ellipticities were converted to molar ellipticity by using the equation:

$$[\theta] = \theta_{\text{obs}}(\text{mrw})/10cl \quad (4),$$

where θ_{obs} is the observed ellipticity in degrees, mrw is the mean residue molecular weight based on 490 amino acids, c is the protein concentration in grams per milliliter, and l is the path length of the cell in centimeters (45).

Intrinsic fluorescence. The protein intrinsic fluorescence was determined at 30 °C on a LS50B luminescence spectrophotometer (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn.) from emission spectra (5 nm bandwidth) recorded over a range of 300 to 400 nm after excitation at 296 nm (2.5 nm bandwidth). All proteins were prepared at a final concentration of 82 µg/mL in buffer A. To minimize the inner filter effects, we used a microcell with a 2 mm path

length placed eccentrically in the cell compartment (46). The wavelength maxima for the different proteins were determined by taking the first derivative of the individual spectra.

Size-exclusion chromatography. The quaternary structure of the wild-type and the mutant enzymes was estimated by size-exclusion chromatography (SEC) on a Superdex 200 HR 10/30 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden), connected to a HPLC system (Waters). The column was equilibrated and eluted at room temperature with buffer A at a flux of 0.5 mL/min, or with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 6.9, containing 0.1 mM EDTA, 20% (v/v) glycerol and 10 mM β -mercaptoethanol (buffer B) at a flux of 0.4 mL/min. Cytochrome c (12.5 kDa), chymotrypsinogen A (25 kDa), ovalbumin (45 kDa), bovine serum albumin (68 kDa), aldolase (158 kDa), catalase (240 kDa) and ferritin (450 kDa) (Boehringer Ingelheim Promeco, Mexico) were used as molecular weight standards. Peak deconvolution was achieved with Jandel PeakFit program. Summation of the deconvoluted components agreed very well with the observed elution profiles.

Thermal inactivation. Reversible enzyme inactivation of the C439S mutant at 37 °C was measured in buffer A using a protein concentration of 1 mg/mL. Samples were incubated for various time periods and the remaining activity was determined immediately after the treatment by the standard assay. Inactivation data were fitted to the equation for a double exponential decay (equation 3). After 60 min of incubation at 37 °C the partially inactivated enzyme was cooled to 20 °C and reactivation was followed for an additional 90 min period. First-order analysis of the time-courses of reactivation were performed using the following equation:

$$E_t/E_0 = E_\infty/E_0 + (1 - E_\infty/E_0)\exp(-kt) \quad (5),$$

where E_t , E_0 , and E_∞ are respectively the activity of the enzyme at time t , zero and at equilibrium (time = ∞) and k is the observed pseudo-first order rate constant of reactivation.

Thermal stability. The thermal stability of the purified recombinant BADH and mutants was tested by incubating the enzyme sample (1 mg/mL) in buffer A at various temperatures for 15 min in sealed vessels. The remaining enzymatic activity was measured at 30 °C by the standard assay.

Urea denaturation. Urea denaturation was performed by incubating the wild-type and C439 mutants (0.4 mg/mL each) for 1 h at 25 °C at the desired urea concentration (0-8 M) in buffer A minus sucrose and was followed by determining the loss of enzyme activity. Aliquots from the incubation media were diluted 100-fold in the assay medium. Controls showed that an urea concentration of 80 mM in the assay medium had no effect on enzyme activity.

The remaining activity data of the thermal or urea denaturation experiments were fitted to the following equation,:

$$A_i/A_0 \times 100 = C^n / (C^n + X^n) \quad (6),$$

where C is the T_m or C_m , the temperature or urea concentration at which the enzyme is inactivated by 50%, respectively. A_0 is the activity observed at 20 °C or 0 M urea; and A_i is that measured at a given temperature or nonzero concentration of urea. X is the urea concentration or temperature; and n is an adjustable parameter related to the cooperativity of denaturation with no physical meaning.

Stability of diluted enzymes. The recombinant wild-type and mutant BADHs were diluted to 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with buffer A or with 25 mM potassium phosphate buffer, at pH 7.0, at 20 °C and then assayed for remaining activity as a function of time.

Stability in the absence of potassium. To completely remove potassium ions, the purified recombinant BADH and C439 mutants were gel-filtered twice, in Sephadex G25 equilibrated with buffer B, by centrifugation at $478 \times g$ for 2 min at room temperature. Immediately after, the samples were subjected to SEC in Superdex 200 column equilibrated and eluted with the same buffer. The enzymatic activity remaining after the whole procedure was measured. The totally or partially inactive enzymes were allowed to reactivate and reassociate by adding back 250 mM KCl and incubating them for an additional 2 h period. The samples were then subjected to a second SEC to determine their oligomeric state. The kinetics of recovery of enzyme activity were followed by measuring the enzyme activity at appropriate time intervals.

Structural model construction. To analyze the possible interactions of the Cys residues in the *P. aeruginosa* BADH tetrameric structure, three-dimensional models of the wild-type and mutant enzymes were prepared on the basis of the coordinates of cod liver BADH (PDB code 1BPW), which is the only BADH whose crystal coordinates are known to date (30). The *P. aeruginosa* BADH sequence shows a 50.8% identity with that of cod liver BADH and both enzymes are tetrameric. An initial three-dimensional model was constructed using a combined automatic (swiss-model) (47) and manual methodology (module homology from Insight II ACCELRYN, Tokyo, Japan). Subsequently, the tetramer was constructed using the program O (48) and the energy of the model was minimized using the program CNS (49). Further mutations and structural

analysis were performed using O and Grasp. The structures analyzed contained a single subunit of the protein with the exception of C439A and C439S mutants, for which a whole tetrameric model was used, because the changes made involve a residue at the inter-subunit interface

RESULTS

Expression and purification of recombinant wild-type and mutant BADHs. The expression of the wild-type and mutants enzymes was performed at 37 °C, with the exception of the mutant C439S, which was expressed at 28 °C, since no activity was obtained at 37 °C. The mutant proteins were catalytically active and showed complete cross-reactivity with polyclonal antiserum raised against the wild-type enzyme (21). All of mutant were expressed at a level approximately equivalent to the wild-type enzyme, as assessed by SDS-PAGE and Western blot analysis of cell-free extracts (Figure 1). However, the mutant C439S exhibited a much lower specific activity in cell-free extracts than did the other mutants or the wild-type, just (4% of the wild-type specific activity), suggesting a significant fraction of inactive enzyme. It was noted that mutant C439S when expressed at 37 °C, was present as a mixture of inclusion bodies and inactive soluble enzyme (results not shown).

All BADH mutants were successfully purified to homogeneity, as judged by SDS-PAGE, following the procedure used with the wild-type enzyme, which consisted of only two steps: an ion exchange chromatography followed by an affinity chromatography in 2', 5'-ADP-Sepharose (21). To our surprise, the activity of the C439A and C439S mutants increased around 3 and 11-fold, respectively, after elution from the ion exchange chromatography column, which is achieved with 250 mM KCl. It was also noted that the

activity of the two mutants decreased during storage in a modified buffer A with a low (25 mM) KCl concentration. Both observations suggest that the Cys439 mutants require a high concentration of K^+ ions or a high ionic strength for stability. Therefore, we raised the original KCl concentration, 25 mM, of the buffer used in the affinity chromatography step to 250 mM and got higher yield of purified enzymes. Thereafter all buffers used in this work for enzyme storage and characterization contained 250 mM KCl, unless otherwise mentioned. We also observed that mutant enzymes bound to the 2', 5'-ADP-Sepharose affinity column and were eluted with the same linear pH-gradient as the wild-type, thus indicating non-participation of the non essential -SH groups in the nucleotide binding process.

Kinetic properties of mutant BADHs. The steady-state kinetics of wild-type and mutant BADHs were examined in the $NADP^+$ - and the NAD^+ -dependent reactions. The kinetic parameters, estimated assuming an ordered mechanism for both reactions, are given in Table 2. Each mutation resulted in some slight changes in kinetic parameters. The K_{ia} value for $NADP^+$ of the mutants was similar to that of the wild-type, while the K_{ia} for NAD^+ was lower in the C353A and C377A mutants. However, the k_{cat} and k_{cat}/K_m values were roughly the same as those of the wild-type for both the $NADP^+$ - and the NAD^+ -dependent activities. We therefore concluded that the non essential Cys residues are not involved in any critical interaction necessary for either catalysis or substrate binding.

Chemical modification of mutant BADHs. The chemical modification of the essential Cys residue of *P. aeruginosa* BADH is conveniently measured by the loss in enzymic activity, as previously reported (22). We have found that the thiol group of this

residue exists as a reactive thiolate at a pH value as low as 5.5 (22) and that its reactivity is modulated by ligands of the enzyme (22,50). To test whether any of the non-essential Cys residues affects the reactivity of the essential one, we carried out chemical modification of the mutant enzymes with methylmethanethiosulphonate (MMTS) at high and low pH. Analysis of the inactivation data indicated pseudofirst-order kinetics with second order inactivation rate constant values at pH 8.0 and 5.5 of 1×10^4 and $8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, respectively, for the wild-type BADH. Values for the mutant enzymes were very similar (results not shown). Moreover, preincubation of the enzymes with saturating NADH before MMTS inactivation produced the same changes in thiol reactivity towards this reagent in wild-type and mutant enzymes (results not shown). Therefore, by these criteria, the reactivity of the catalytic Cys residue was found not to be affected by mutation of any of the non-essential Cys residues. It was, however, affected either by the high ionic strength or the high KCl concentrations at which the chemical modification was performed, for the changes in reactivity triggered by incubation with the coenzyme were much less pronounced than those previously found at 25 mM KCl concentration (22).

Structural properties of mutant BADHs. The conformational integrity of the mutant enzymes was probed by circular dichroism spectroscopy. The CD spectra of all of them was almost identical with that of the wild-type enzyme (Figure 2A), indicating correct folding. By size-exclusion chromatography (SEC) we found that the wild-type and mutant enzymes eluted as a single sharp peak (Figure 2C), which corresponds to a tetramer. However, the protein intrinsic fluorescence showed differences in the tertiary structure between Cys439 mutants and the wild-type enzyme, particularly in the case of the C439S mutant. The observed increased in tryptophan fluorescence without any shift in

emission λ_{\max} , 336 nm, (Figure 2B) suggests that these mutants have alterations in the environment of their tryptophan residues.

Thermal stability of enzymes. The initial observation that C439S cannot be obtained in the expression system in an active form at 37 °C suggested that it was less stable than the wild-type or the other mutant proteins. This was confirmed by incubating the purified enzymes at 37 °C. As can be seen in Figure 3A, the C439S mutant lost 60% of its original activity with a half time of ~7 min, whereas the C439A mutant was almost stable and the wild-type enzyme retained its activity in a 60 min incubation period.

We estimated the thermostability of the five enzymes, as shown in Figure 3B. All mutants were less stable than the wild-type, in the order of stability: wild-type > C353A > C377A > C439A > C439S (Table 3). For the two latter mutants, the temperature at which the enzyme is inactivated by 50% for a 15 min incubation period T_m , is 7 and 14 °C, respectively, below that of the wild-type enzyme. The cooperativity of thermal inactivation, measured by the parameter n in equation 6, decreased in the same order as the stability. Denaturation of the C439 mutants was much less cooperative than the wild-type, suggesting that significantly fewer interactions are involved in maintaining the native structure of these mutants.

Urea denaturation. The stability of the wild-type and of the two C439 mutant BADHs was also determined by measuring the dependence of enzyme activity on urea concentration. For the wild-type enzyme and the C439 mutants the exponential loss in activity at 2 M urea is complete in less than 1 h (results not shown). Therefore, the urea unfolding values shown in Figure 4 were obtained by incubating the enzyme with the indicated urea concentration for 1 h. The concentration of urea that results in 50% loss of

activity, C_M , was 1.4 M for the wild-type enzyme, and 0.4 M and 0.5 M for C439A and C439S mutants, respectively (Table 3). The cooperativity of unfolding by urea of the mutant enzymes was decreased to a similar extent as that of thermal denaturation, about 35% of the wild-type value for the C439A mutant and 25% for the C439S. Renaturation was attempted by diluting the 8 M urea-treated samples 100-fold or by extensive dialysis of the samples. No recovery of activity was followed. Controls showed that an urea concentration of 80 mM in the assay medium had no effect on enzyme activity. As urea denaturation of wild-type BADH was not reversible under our experimental conditions, we did not attempt to obtain thermodynamic parameters from these data.

Stability to dilution. At a protein concentration of 3 $\mu\text{g/mL}$, a concentration at which the wild-type enzyme and C353 and C377 mutants were stable, C439 mutants lost activity, both at 250 mM KCl (Figure 5A) or 25 mM KCl (Figure 5B). In accordance with our observation during the purification procedure that C439 mutants required high concentrations of K^+ ions for stability, both mutants were inactivated much faster at low than at high K^+ . C439S was much more sensitive to dilution than C439A, particularly at high K^+ concentration. At high K^+ , inactivation was monophasic, following first order kinetics and reaching an equilibrium point at a residual enzyme activity of ~20% for the C439S mutant and of ~85% for the C439A mutant. The first order rate constant values were 0.013 ± 0.001 and $0.116 \pm 0.07 \text{ min}^{-1}$ for C439S and C439A, respectively. At low K^+ , the inactivation kinetics were biphasic, with fast first phases involving a proportion of enzyme activity very similar to which was lost at high K^+ .

Effect of potassium on the activity and oligomeric states. Previous works in our group showed that *P. aeruginosa* BADH is quickly inactivated (21) and dissociated (20)

into monomers in the absence of monovalent cations, such as K^+ or NH_4^+ , in a reversible process. In an attempt to correlate the losses in enzyme activity observed in diluted enzyme preparations at low K^+ concentration with lost of the quaternary structure, wild-type and C439 mutants (2 mg/mL each) were subjected to SEC in a Superdex 200 column immediately after K^+ ions had been complete removed of by gel filtration of the samples in buffer B. The whole procedure resulted in a lost of 77% and 100% of the original activity of the wild-type and C439 mutants, respectively. Deconvolution of the SEC elution profiles showed that the wild-type BADH was predominantly as tetramer (75.36%), the C439A mutant as dimer (74.33%) and the C439S mutant as monomer (68.73%) (Figure 6 and Table 4). After addition of K^+ ions (to give a final concentration of 250 mM) to the K^+ -depleted samples which had been totally inactivated (C439 mutants) or inactivated to 25% of its original activity (wild-type), the three enzymes exhibited a different degree of recovery of activity, reaching after a 2 h incubation period 57% of the initial activity, the wild-type enzyme, 50% the C439A mutant, and 10% the C439S mutant. The kinetics of reactivation are shown in Figure 7A. In a similar experiment, in which all enzymes were allowed to inactivate completely by prolonged incubation in the absence of K^+ before adding back 250 mM KCl, the wild-type enzyme recovered 45% of its original activity and was predominantly as tetramer (80%), the C439A recovered 22% and was still a mixture of tetramers, dimers and monomers, and C439S did not recover any activity and was predominantly as dimers (41%) and monomers (44%) (Figures 7B, 7C and 7D and Table 4).

The results of these experiments summarized in Table 4, clearly show the greater propensity of the C439 mutants to be dissociated at low ionic strength. Also, it is clear

that a portion of the tetramers of these enzymes were inactive, which suggests that the dissociation and reassociation processes are independent of K^+ activation. These findings agree with previous ones which showed that the enzyme reassociated in to tetramers when the ionic strength was raised by adding NaCl, but that the recovery of enzymatic activity required the presence of K^+ ions (20).

Modelling studies. A *P. aeruginosa* BADH three-dimensional structure model (Figure 8A) was constructed based on the sequence homology and the three-dimensional structure of cod liver BADH (30). According to this model, the enzyme can be described as a dimer of dimers and has a general structural organization similar to that of cod liver BADH and other tetrameric ALDHs whose three-dimensional structures are known (30, 23-29). From this model, we conclude that none of the cysteine residues is in a favorable position to form a disulfide bond. C353 (Figure 8B) and C377 (Figure 8C) appear to be located at the protein surface with their sulfur atoms buried, and C439 at the inter-subunit interface between the two monomers forming a dimeric unit. The possible formation of a hydrogen bond between C439 and K477 of the other subunit is observed in the model (Figure 8D). The distance between the sulfur atom of Cys439 and the hydrogen atom of K477 is shorter than 2.83 Å and the donor acceptor angle is below 20°. Interestingly, K477 is a conserved residue in most ALDHs sequenced to date. The K477 residue also behaves in a particular way in the two cod BADH structures (apo and holo forms) already determined (30). When NAD^+ is bound, the analysis of the electron density map shows two possible conformations of the residue K477, being one of them exactly the one we found in the model for *Pseudomonas* BADH, i.e. K477 is forming two hydrogen bonds with a water molecule and residue E154. In the proposed model K477 may also be

established by two more hydrogen bonds, in addition to the proposed with C439, both of them between the Nz atom and the main chain O atom from residues I431 and L434.

DISCUSSION

This study has focused on the importance of the cysteine thiol groups of *P. aeruginosa* BADH, excluding the essential Cys involved in the reaction mechanism.

Single mutations of these residues by site-directed mutagenesis produced fully active enzymes with kinetics and reactivity of their essential thiol group very similar to the wild-type enzyme.

Among all BADHs whose amino acid sequence is known, C353 is the most conserved non essential cysteine residue (Table 1). However, substitutions at this position are very diverse. Cys377, on the contrary, is substituted only by the hydrophobic aliphatic residues I and even more frequently by V, which suggests much more stringent structural constraints in position 377 than in 353. This conclusion is consistent with our model, which shows that C477 is buried inside the structure in a hydrophobic environment, whereas C353, even though surrounded by mainly hydrophobic residues (L307, V310, L352 and V373), is close to the protein surface, so the lateral chains of more volumetric residues (such as F, Y, or H) might be exposed to the solvent. In regard with C439, V is also the most frequent residue present at this position, followed by L and I (table 1), which suggest that hydrophobic interactions are important in this protein region.

Sequence alignments of ALDHs, including BADHs, showed that residues which in the *P. aeruginosa* BADH model are three dimensionally close to 5 Å from the residue C439 are highly conserved. This includes four residues, W440, W444, F280 and F281,

which keep its aromatic character in all ALDHs, and may be related with electronic movements through the protein structure. The global integrity of the sequence of this region might be essential for proper folding and thus has been largely maintained through the course of evolution, although the identity of individual residues, such as C439, is not so critical as long as the mutation is conservative. The most common residue in ALDHs at the equivalent position of C439 is valine (77.2% of the ALDHs). The possible single base pair mutations of V would lead to I, L, M, F, A, D, E or G. Of these, only L, I, F and M would be considered conservative. Accordingly, L and I are found in 2.6 and 6.0%, respectively, of the sequenced ALDHs, while M and F are formed in 0.8%, and the other residues are not found at all.

The residues contacted by C439 are more conserved than those contacted by the other non-conserved Cys residues. It seems therefore that the highly conserved and hydrophobic residues surrounding C439 might be crucial in maintaining both the *in vivo* and *in vitro* structural stability of *P. aeruginosa* BADH. However, we observed in the wild-type model that the thiol group of the side chain of C439 is in a position favorable to make a good hydrogen bond with one of the hydrogens from the Nz atom of Lys477 of the neighboring subunit. In the C439S model, the distance between donor and acceptor is increased by 0.3 Å, which might explain the differences in stability found between the wild-type and C439S proteins. In addition, the hydrogen bonding properties of Ser and Cys are sufficiently different to explain the instability of C439 mutants. As shown in several site-directed mutagenesis studies (51-55), S and C are not conservative replacements for each other as hydrogen bond donors.

It requires two putative mutations to change a C to a V codon *via* either F, or G. Two mutations are also required for a change of C to L, *via* F or R, and to I *via* F and S. None of the simple substitutions which would give rise to these amino acid residues is found in the known ALDHs sequences at position 377 or 439. Therefore it appears that there are no one base non-silent mutation available from C377 or C439 to these hydrophobic residues. Whether there is a neutral mutation pathway from the hydrophobic residues V or L to C in BADH remains to be investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to RAM-C. from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-2552P-N) and from the Dirección General de Apoyo al Personal Académico de UNAM (DGAPA-IN 210198). LGS was a recipient of a scholarship from CONACYT and Dirección General de Apoyo al Personal Académico de UNAM (DGAPA). We thank C. Mújica-Jiménez for technical assistance with the size-exclusion chromatography.

REFERENCES

1. Falkenberg, P. and Strom, A. R. (1990) *Biochem. Biophys. Acta* 1034, 253-259.
2. Boch, J., Kempf, B. and Bremer, E. (1994) *J. Bacteriol.* 176, 5364-5371.
3. Mori, N., Kawakami, B., Hyakutome, K., Tani, Y. and Yamada, H. (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44, 3015-3016.
4. Weretilnyk, E. A. and Hanson, A. D. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 271, 56-63.

5. Valenzuela-Soto, E. M. and Muñoz-Clares, R. A. (1994) *J. Plant Physiol.* 143, 145-152.
6. Guzmán-Partida, A. M. and Valenzuela-Soto, E. M. (1998) *Comp. Biochem. Biophys.* Part B 119, 485-491.
7. Arakawa, T. and Timasheff, S. N. (1985) *Biophys. J.* 47, 411-414.
8. Nagasawa, T., Kawabata, Y., Tani, Y. and Ogata, K. (1976) *Agr. Biol. Chem.* 40, 1743-1749.
9. Velasco-García, R., González-Segura, L. and Muñoz-Clares, R. A. (2000) *Biochem. J.* 352, 675-683.
10. Pepsin, S. R. and Candia O. A. (1982) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22, 651-659.
11. Wright, J. R. and Clements, J. A. (1987) *Am. Rev. Respir. Dis.* 136, 426-444.
12. Kilbourne, J. P. (1978) *Lancet* i, 334.
13. Hempel, J., Nicholas, H. and Lindhal, R. (1993) *Protein Sci.* 2, 1890-1900.
14. Jakoby, W.B. (1958) *J. Biol. Chem.* 232, 89-97.
15. Nirenberg, M.W. and Jakoby, W.B. (1960) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 46, 206.
16. Deitrich, R.A. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 119, 253-263.
17. Hjelle, J. J., Grubbs, J. H. and Petersen, D. R. (1982) *Toxicol. Lett.* 14, 35-43.
18. Simpson, V. J., Baker, R. and Deitrich, R. A. (1985) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 30, 193-203.
19. Kobashi, M.K. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 158, 2772-2778
20. Valenzuela-Soto, E., Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Gaviria-González, L. y Muñoz-Clares, R. A. (2003) *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 139-148.

21. Velasco-García, R., Mújica-Jiménez, C., Mendoza-Hernández, G. and Muñoz-Clares, R. A. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 1292-1300.
22. González-Segura, L., Velasco-García, R. and Muñoz-Clares, R. A. (2002) *Biochem. J.* **361**, 577-585.
23. Ni, L., Zhou, J., Hurley, T. D. and Weiner, H. (1999) *Protein Sci.* **8**, 2784-2790.
24. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J. and Nilges, M. (1998) *Acta Cryst. Sect. D Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921.
25. Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, K. E., Kitson, T. M. and Baker, E. N. (1998) *Structure* **6**, 1541-1551.
26. Ahvazi, B. A., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E. and Vrielink, A. (2000) *Biochem. J.* **349**, 853-861.
27. Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. and Aubry, A. (1999) *J. Mol. Biol.* **290**, 161-173.
28. Cobessi, D., Tete-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G. and Aubry, A. *J. Mol. Biol.* **300**, 141-152.
29. Liu, Z. J., Sun, Y. J., Rose, J., Chung, Y. J., Hsiao, C. D., Chang, W. R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J. and Wang, B. C. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 317-326.
30. Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramaswamy, S., Hjelmqvist, L., Jörnvall, H. and Eklund, H. (1998) *Protein Sci.* **7**, 2106-2117.
31. Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M. et al., (2000). *Nature (London)* **406**, 959-964.

32. Buell R., Joardar V., Khouri H., Fedorova N., Tran B., Russell D., Berry K., Utterback T., Van Aken S. and Feldblyum T. "Complete Sequence of *Pseudomonas syringae*"; Unpublished.
33. Nelson K., Paulsen I., Weinell C., Dodson R., Hilbert H., Fouts D., Gill S., Pop M., Martins Dos Santos V. and Holmes M. (2002) *Environ. Microbiol.* 4, 799-808.
34. Boyd, L. A., Adam, L., Pelcher, L. E., McHughen, A., Hirji, R. and Selvaraj, G. (1991) *Gene* 103, 45-52
35. da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Reinach, F. C., Farah, C. S., Furlan, L. R., Quaggio, R. B., Monteiro-Vitorello, C. B., Van Sluys, M. A., Almeida Jr N. F. and Alves, L. M. C. (2002) *Nature* 417, 459-463.
36. Wood V., Gwilliam R., Rajandream M.A., Lyne M., Lyne R., Stewart A., Sgouros J., Peat N., Hayles J. and Baker S. (2002), *Nature* 415, 871-880
37. Clark, M., Johnson, S. L., Lehrach, H., Lee, R., Li, F., Marra, M., Eddy, S., Hillier L., Kucaba, T. and Martin, J. "WashU Zebrafish EST Project 1998"; Unpublished.
38. Lin, S. W., Chen, J. C., Hsu, L. C., Hsieh, C.-L. and Yoshida, A. (1996) *Genomics* 34, 376-380.
39. Chern, M. K. and Pietruszko, R. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 561-568.
40. Rodríguez-Zavala, J. S. and Weiner, H. (2002) *Biochemistry* 41, 8229-8237.
41. Zhou, J. and Weiner, H. (2001) *Protein Sci.* 10, 1490-1497.
42. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-256.
43. Marquardt, D.W. (1963) *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431-441.
44. Cleland, W. W. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* 467, 104-137.

45. Fasman, G. D (1996) *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*. pp 25-61. Plenum Press, New York.
46. Chen, R. F. and Hayes, Jr. J. E. (1965) *Anal. Biochem.* 1, 523-529.
47. Schwede, T., Diemand, A., Guex, N. and Peitsch, M. C. (2000) *Res. Microbiol.* 151, 107-112.
48. Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan S. W. & Kjeldgaard M. (1991) *Acta Cryst. Sect. A* 47, 110-119.
49. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., Delano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Cryst. Sect. D Biol. Crystallogr.* 54, 905-921.
50. Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C. and Contreras-Díaz, L. (2003) *Chem. Biol. Interact.* 143-144, 129-137.
51. Gloss, L. M., Specer, D. E. and Kirsch, J. F. (1996) *Proteins* 24, 195-208.
52. Stickle, D. F., Presta, L. G., Dill, K. A. and Rose, G. D. (1992) *J. Mol. Biol.* 226, 1143-1159.
53. Gregoret, L. M., Rader, S. D., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. (1991) *Proteins* 9, 99-107.
54. He, J. J. and Quijcho, F. A. (1991) *Science* 251, 1479-1481.
55. Chou, W. Y. and Matthews, K. S. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 18314-18319.

Table 1: Sequence conservation in the positions of cysteine at *P. aeruginosa* through

BADH sequences from different sources. With asterisk are marked those BADHs

possessing the four Cys residues present in *P. aeruginosa* BADH.

Organism	Cys 286	Cys 353	Cys 377	Cys 439
*BADH <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	QV+C+TN	LL+C+GG	TD+C+RD	GI+C+WI
*BADH <i>Pseudomonas putida</i>	QV+C+TN	VL+C+GG	TD+C+TD	GI+C+WI
*BADH <i>Escherichia coli</i>	QV+C+TN	VL+C+GG	TD+C+SD	GI+C+WI
BADH <i>Yersinia pestis</i>	QV+C+TN	LL I GG	TH+C+RD	GI+C+WI
*BADH <i>Xanthomonas axonopodis</i>	QV+C+TN	LL+C+GG	SD+C+TD	GI+C+WV
BADH <i>Xanthomonas campestris</i>	QV+C+TN	LL F GG	SD+C+TD	GI+C+WI
BADH Putative <i>Halomonas elongata</i>	QI+C+TN	VL A GG	TD+C+TD	GI+C+WI
BADH <i>Sinorhizobium meliloti</i>	QV+C+SN	LV T GG	AD V TD	GT L WI
BADH <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	QV+C+SN	LI T GG	AD V TD	GT L WI
BADH <i>Brucella melitensis</i>	QV+C+SN	LA+C+GG	AD V TD	GT+C+WI
BADH <i>Brucella suis</i>	QV+C+SN	LA+C+GG	AD V TD	GT+C+WI
BADH <i>Mesorhizobium loti</i>	QI+C+SN	LA+C+GG	TG V TD	GT+C+WI
BADH <i>Sinorhizobium meliloti</i>	QI+C+SN	QM A PP	TN V TD	GT V WI
BADH <i>Bacillus subtilis</i>	QV+C+SA	LE T GG	SN+C+NS	GT V WI
BADH <i>Streptomyces coelicolor</i>	QV+C+SA	LR+C+GG	DN+C+HR	GT V WI
BADH <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	EA+C+TA	CV V GG	TH V QT	GM+C+SL
BADH <i>Thermoplasma volcanium</i>	QL+C+ES	IF Y QK	DK V SE	GT V WI
BADH <i>Ralstonia solanacearum</i>	QT+C+SA	LI A GG	GN V KP	GQ V DI
*BADH <i>Gadus callarias</i> (Baltic cod)	QV+C+TN	VL+C+GG	DN+C+RD	GT+C+YI
BADH <i>Caenorhabditis elegans</i>	QV+C+SN	KL+C+GG	TG I TP	GN V YV
*BADH <i>Takifugu rubripes</i> (pufferfish)	QV+C+TN	VL+C+GG	DN+C+RD	GT+C+YI
*BADH <i>Homo sapiens</i>	QV+C+CN	VL+C+GG	TN+C+RD	GT+C+FI
*BADH 9A <i>Mus musculus</i>	QV+C+CN	VL+C+GG	TN+C+RD	GT+C+YI
*BADH <i>Rattus norvegicus</i>	QV+C+CN	VL+C+GG	TN+C+TD	GT+C+YI
BADH <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	QV+C+SA	LV T GG	AN V EH	GT V WM
BADH <i>Beta vulgaris</i>	QI+C+SA	IL+C+GG	SD I ST	GA V WV
BADH <i>Atriplex hortensis</i>	QI+C+SA	IL+C+GG	TD I TT	GA V WV
BADH <i>Atriplex centralasiatica</i>	QI+C+SA	IL+C+GG	TD I TT	GA V WV
BADH <i>Atriplex prostrata</i>	QI+C+SA	IL+C+GG	TD I TT	GA V WV
BADH <i>Atriplex centralasiatica</i>	QI+C+SA	IL+C+GG	TD I TT	GA V WV
BADH <i>Spinacia oleracea</i>	QI+C+SA	IL Y GG	TD I ST	GA V WV
BADH <i>Suaeda liaotungensis</i>	QI+C+SA	IL+C+GG	TD I TT	GA V WV
BADH <i>Amaranthus hypochondriacus</i>	QI+C+SA	IL+C+GG	SD V ST	GI V WV
BADH <i>Avicennia marina</i>	QI+C+SA	IL+C+GG	TD V KT	GA V WV
BADH <i>Arabidopsis thaliana</i>	QI+C+SA	VL+C+GG	SN V TT	GI V WV
BADH <i>Triticum aestivum</i> (Wheat)	QI+C+SA	IL T GG	TD I NT	GC I WV
BADH <i>Hordeum vulgare</i>	QV+C+SA	IL H GG	TG V ST	GI V WI
BADH <i>Oryza sativa</i> (Rice)	QV+C+SA	IL Y GG	TN V ST	GI V WI
BADH <i>Sorghum bicolor</i> (Sorghum)	QV+C+SA	IL Y GG	TD V ST	AI D --
Occurrence of Cys residues	100%	58.5%	36.5%	41.4%

Table 2: Kinetic parameters^a of *P. aeruginosa* BADH wild type and mutants

	K_i (NADP) (μM)	K_m (NADP) (μM)	K_m (BA) (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m (NADP) ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_m (BA) ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
NADP⁺-dependent reaction						
wild type	48 ± 8	107 ± 10	434 ± 33	648 ± 24	3.0 × 10 ⁶	7.5 × 10 ⁵
C353A	58 ± 12	67 ± 8	313 ± 30	394 ± 16	2.9 × 10 ⁶	6.3 × 10 ⁵
C377A	48 ± 11	165 ± 21	576 ± 62	435 ± 26	1.3 × 10 ⁶	3.8 × 10 ⁵
C439A	70 ± 12	70 ± 8	296 ± 25	511 ± 17	3.6 × 10 ⁶	8.6 × 10 ⁵
C439S	77 ± 16	60 ± 10	372 ± 42	347 ± 17	2.9 × 10 ⁶	4.7 × 10 ⁵

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

116

*

Table 2 (continuation)

NAD⁺ -dependent reaction

wild type	262 ± 40	375 ± 37	355 ± 42	754 ± 41	1.0 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁶
C353A	74 ± 10	157 ± 16	419 ± 42	514 ± 30	1.6 × 10 ⁶	6.1 × 10 ⁵
C377A	91 ± 33	411 ± 89	567 ± 118	402 ± 50	4.9 × 10 ⁵	3.5 × 10 ⁵
C439A	256 ± 62	310 ± 46	311 ± 55	675 ± 51	1.1 × 10 ⁶	1.1 × 10 ⁶
C439S	372 ± 86	254 ± 36	243 ± 44	393 ± 44	7.7 × 10 ⁵	8.1 × 10 ⁵

^aInitial velocities were obtained in potassium phosphate buffer at 30 °C, pH 8.0, under the conditions described in the Materials and Methods. Results shown the estimated parameters ± the standard error and were estimated by a fit of the initial velocity data to equation 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

117

Table 3: Thermal and chemical stability^a of *P. aeruginosa* BADH wild-type and mutants

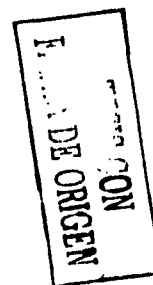
Enzymes	T_m (°C)	n	C_m (M)	
Wild-type	50.7 ± 0.3	54.9 ± 23.2	1.4 ± 0.0	6.2 ± 0.2
C353A	49.6 ± 0.1	53.8 ± 15.3	-	-
C377A	46.0 ± 0.5	51.1 ± 24.8	-	-
C439A	43.7 ± 0.3	20.7 ± 2.3	0.4 ± 0.0	2.2 ± 0.1
C439S	37.3 ± 0.3	12.2 ± 1.2	0.5 ± 0.0	1.6 ± 0.1

^aResults shown are the estimated T_m and C_m values \pm the standard error of the estimates, and were obtained from a fit of the inactivation data shown in Figure 3B and 4 to equation 6. T_m and C_m are defined as the temperature or the urea concentration, respectively, at which the protein retains 50% of its original activity. n represents the cooperativity of the loss of activity.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 4: Effect of potassium on the activity^a and the quaternary structure of *P. aeruginosa* wild-type and mutant BADHs

Enzymes	Tetramer (%)	Dimer (%)	Monomer (%)
Inactivation by removal ^b of K ⁺			
Wild-type	75 (23) ^c	16	9
C439A	16 (10)	74	10
C439S	12 (0)	20	68
Reactivation ^d by 250 mM KCl			
Wild-type	80 (45)	14	6
C439A	39 (22)	29	32
C439S	15 (0)	41	44



^aThe enzymes were fully active and tetrameric before removal of K⁺ by quick gel filtration. ^bRemoval of K⁺ ions was achieved as described in Materials and Methods. ^cThe percentage of the initial activity associated with tetramer is given within parenthesis. Dimers and monomers were devoided of activity. ^dThe enzymes were fully inactivated by prolonged incubation in the absence of K⁺. The oligomeric state and enzyme activity were determined after ~ 2 h incubation with 250 mM KCl.

LEGENDS TO FIGURES

FIGURE 1: (A) SDS-PAGE (8% gel) of the purified wild-type and BADH mutants (0.44 μg of protein). Lanes: 1, M_r standards; 2, wild-type; 3, C353A; 4, C377A; 5, C439A; and 6, C439S. 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) Western blots of purified *P. aeruginosa* BADH (lane 1) and cell free extracts from *E. coli* BL21(DE3) pLysS containing the full-length *P. aeruginosa* wild-type or mutated BADH-encoding genes expressed at 37 °C. Lanes: 2, wild-type; 3, C353A; 4, C377A; 5, C439A; 6, C439S; and 7, C439S expressed at 28 °C. Samples were subjected to SDS-PAGE (8% gel), transferred to a nitrocellulose membrane, and probed with anti-*P. aeruginosa* BADH antibody.

FIGURE 2: (A) Circular dichroism spectra (protein concentration: 270 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (B) intrinsic fluorescence emission spectra (protein concentration, 82 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and (C) size exclusion chromatography (protein concentration, 2.0 mg/mL) of pure wild-type and mutant BADH. Wild-type (solid line), C353A (dashed line), C377A (dotted line), C439A (dashed and dotted line), C439S (short dashed line).

FIGURE 3: Thermal stability of *P. aeruginosa* wild-type and mutant BADHs. (A) The enzymes (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were incubated in buffer A at 37 °C in buffer A and the remaining activity was determined as a function of time by the standard assay. (B) The enzymes (1

mg/mL) were incubated in buffer A at the indicated temperatures for 15 min. Data are the mean value \pm S.E.M. of two different experiments. In B, S.E.M. values have been omitted for clarity but were always less than 8% of the mean value. Wild-type (solid square), C353A (open square), C377A (solid circle), C439A (open circle) and C439S (solid triangle).

FIGURE 4: Dependence of enzyme activity on urea. Samples containing 0.4 mg/mL enzyme were incubated in buffer A minus sucrose at 25 °C with 0-7 M urea and enzyme activity determined after 1 h incubation. The activity data lines were fitted to equation the 6. Wild-type (solid square), C439A (solid circle) and C439S (solid triangle).

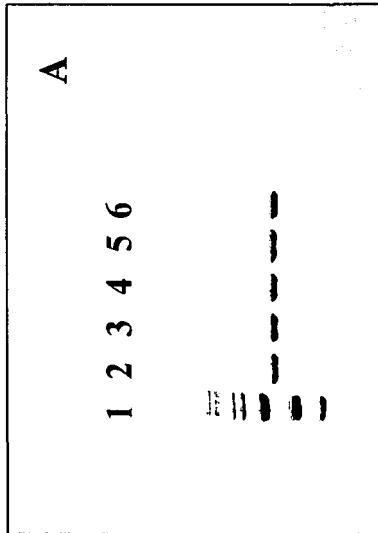
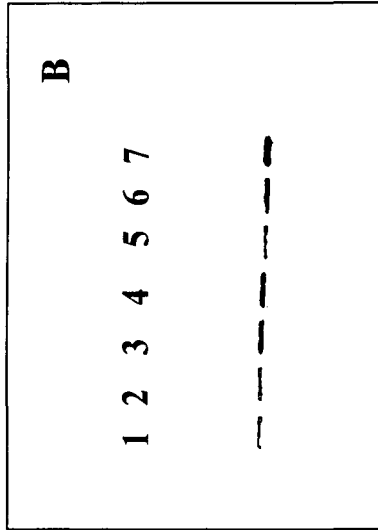
FIGURE 5: Effect of dilution on the stability of BADH wild-type (solid square), C439A (open circle) and C439S (solid triangle). (A) The enzymes were diluted to 3 μ g/mL with buffer A, or (B) with 25 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, and incubated at 20 °C for the indicated lengths of time. The remaining enzyme activity as a function of time was measured by the standard assay. Results are means \pm S.E.M. of two different experiments.

FIGURE 6: Effect of K⁺ ions on BADH oligomeric state of wild-type and C439 mutant proteins (2 mg/mL each) were subjected to SEC in a Superdex 200 column immediately after removal of K⁺ ions by quick gel filtration in Sephadex G25. Both kind of columns were equilibrated with buffer B. The SEC elution profiles were monitored for protein and for BADH activity. (A) Protein elution profiles; (B), (C), and (D) Peak deconvolution of the elution profiles of wild-type, C439A and C439S, respectively. The dashed lines, the

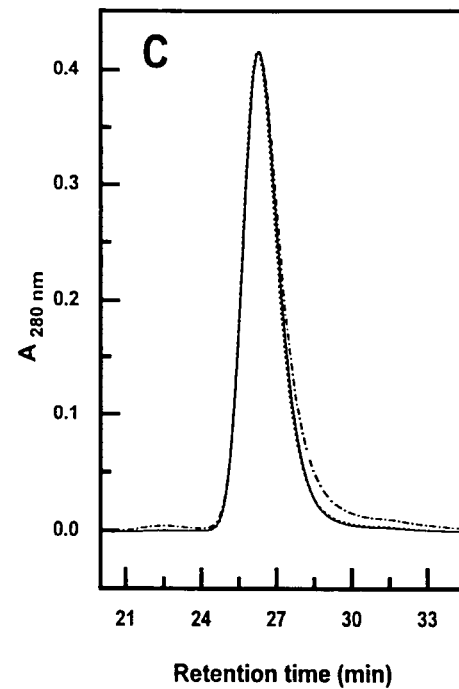
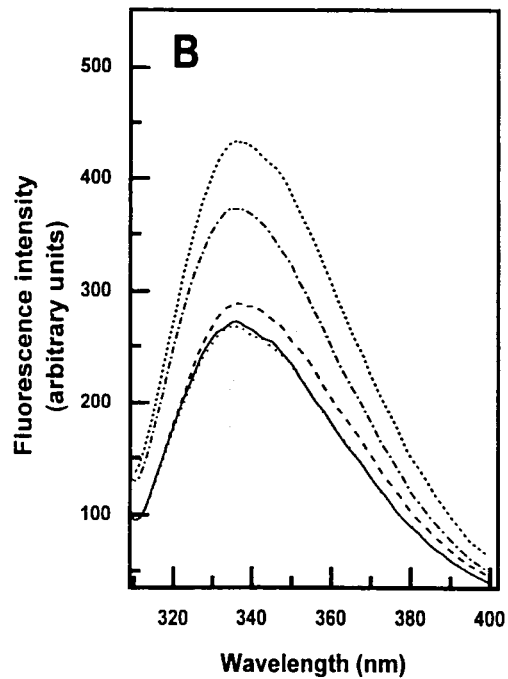
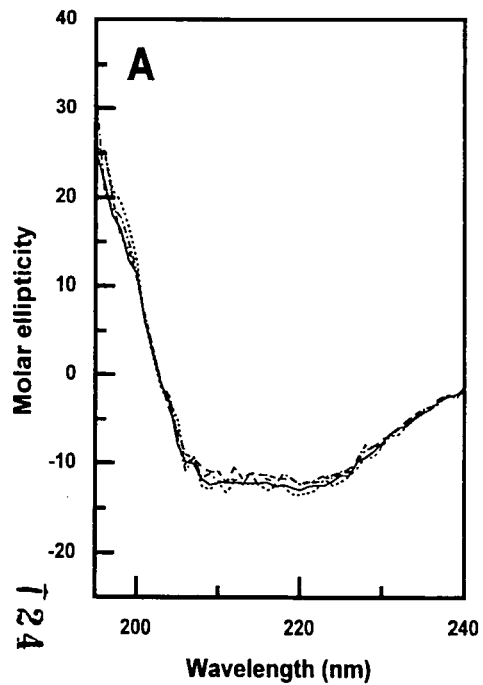
dotted lines and the dashed and dotted lines showed the tetrameric, dimeric and monomeric structures, respectively.

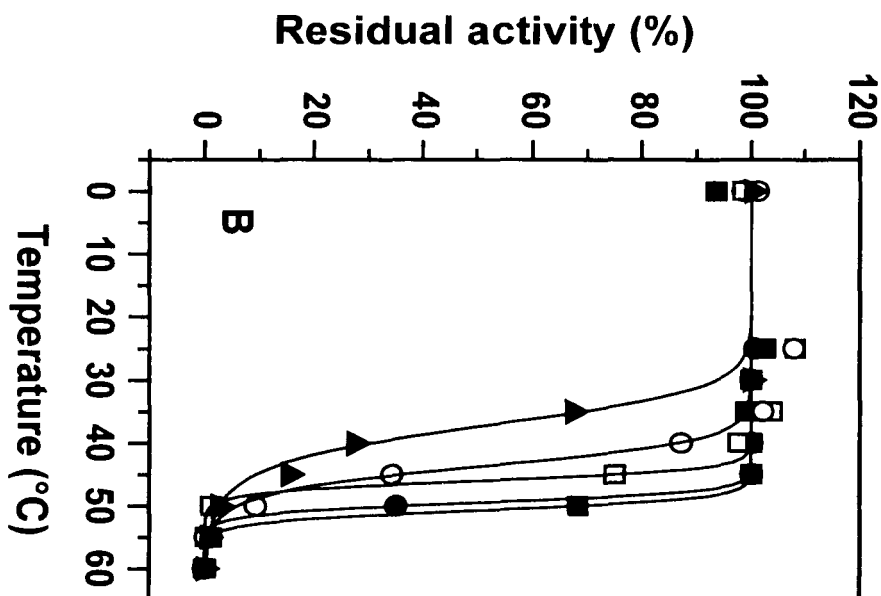
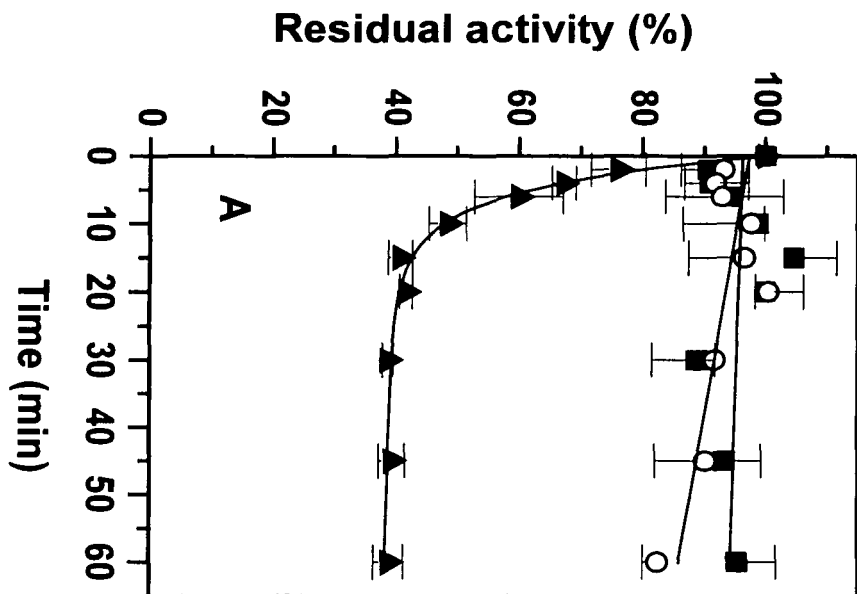
FIGURE 7: (A) Reactivation by 250 mM potassium of the K^+ -depleted wild-type and BADH mutants. The enzymes (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were gel-filtered twice to complete remove K^+ . Reactivation was carried out by adding 250 mM KCl and incubating for an additional 2 h. The recovery of activity was followed as a function of time by the standard assay. Wild-type (solid circle), C439A (open circle) and C439S (solid triangle). (B) Gel filtration of the treated enzymes with 250 mM KCl was performed as indicated in Materials and Methods. The dashed, the dotted and the dashed and dotted showed the tetrameric, dimeric and monomeric structure, respectively. Peak deconvolution was achieved with Jandel Peak Fit program.

FIGURE 8: Three dimensional model of BADH tetramer. The model was constructed on the basis of the crystal coordinates of BADH from cod liver. In the panel A the spheres show the four cysteinyl residues (red C286, blue C353, green C377 and magenta C439). Stereo views show the environment of C353 (panel B), C377 (panel C) and C439 (panel D).



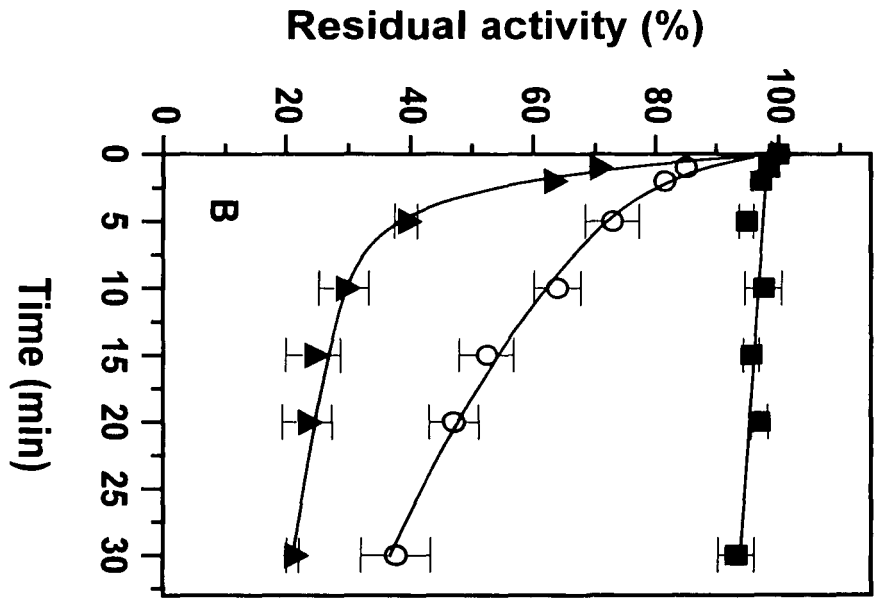
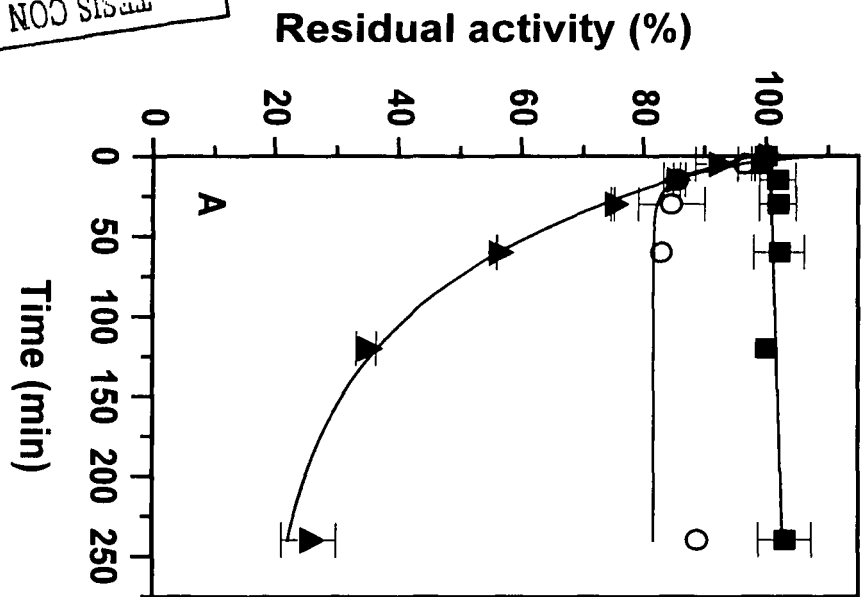
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



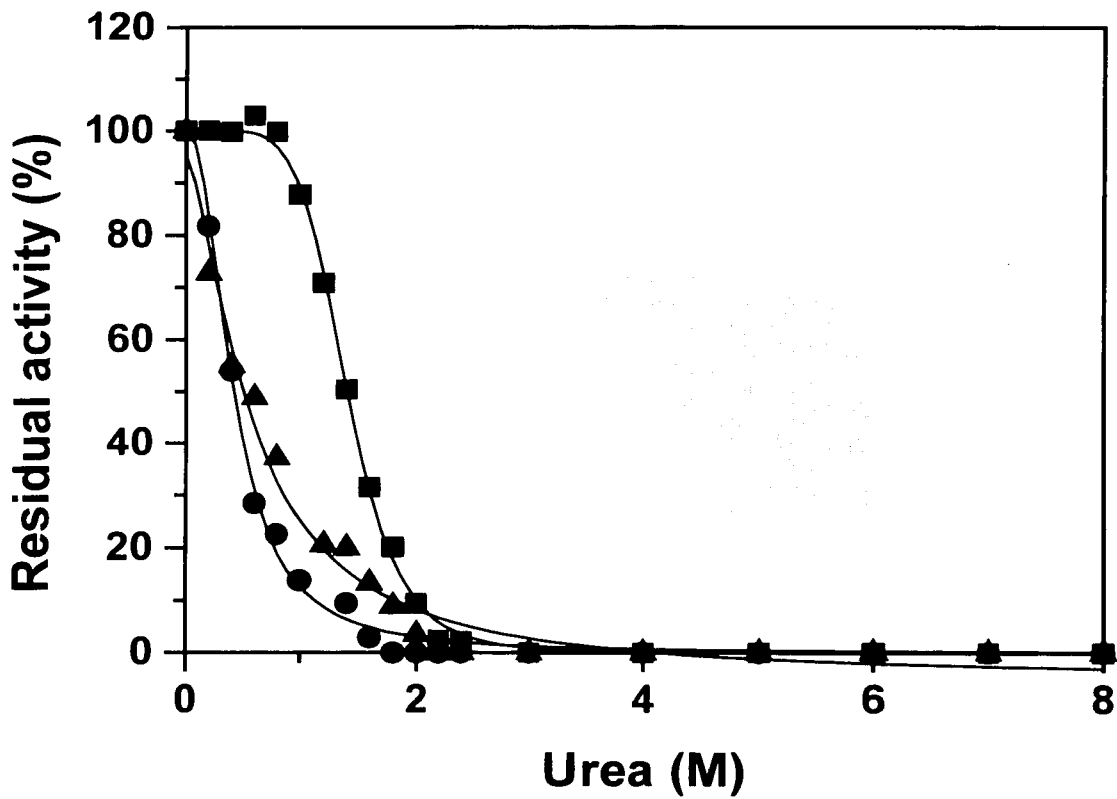


TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

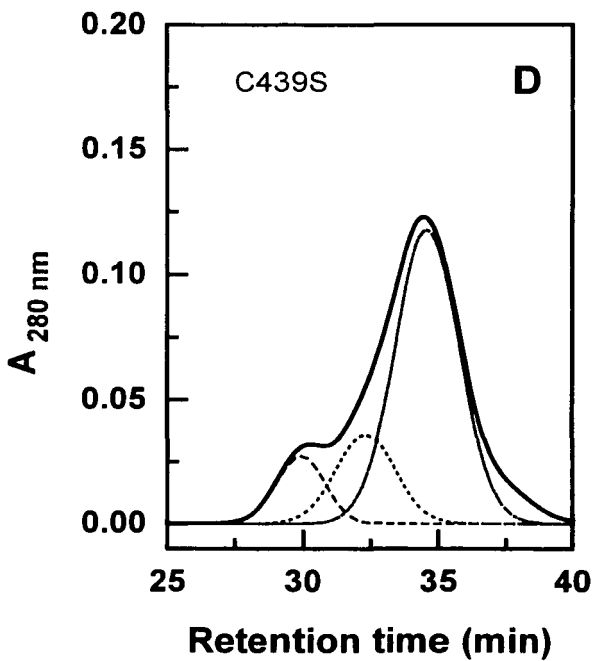
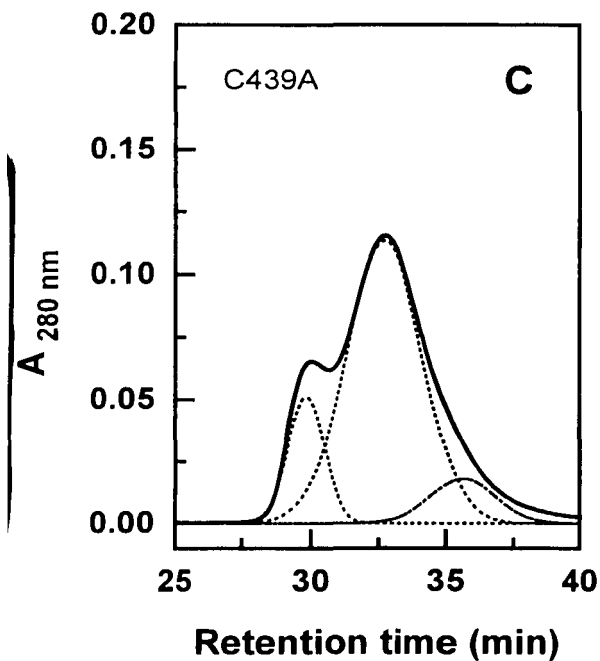
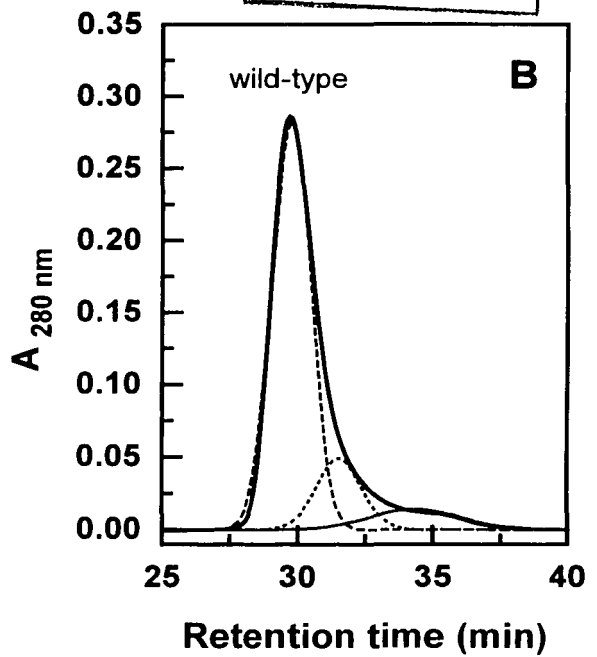
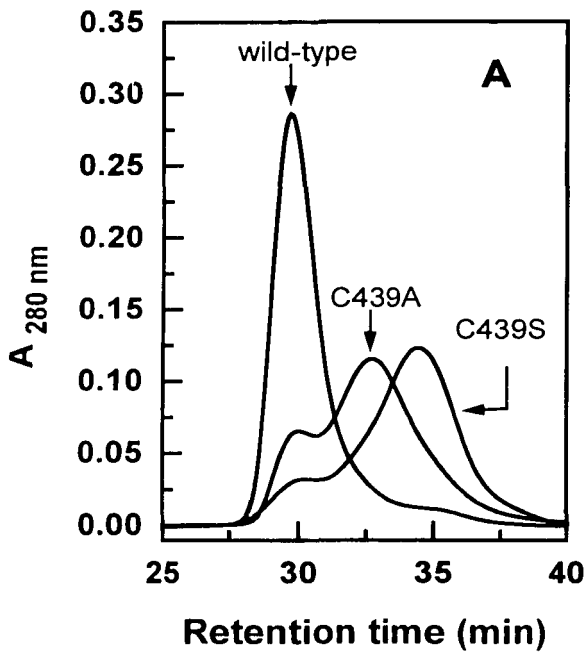
FALTA DE ORIGEN
TESIS CON

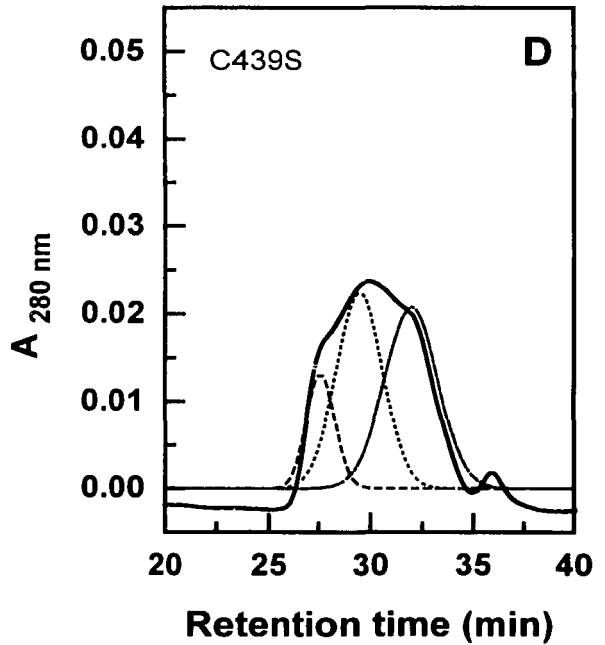
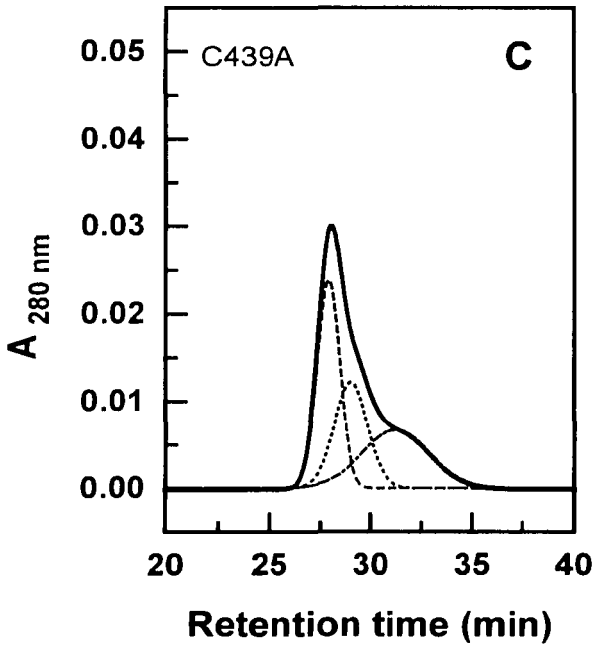
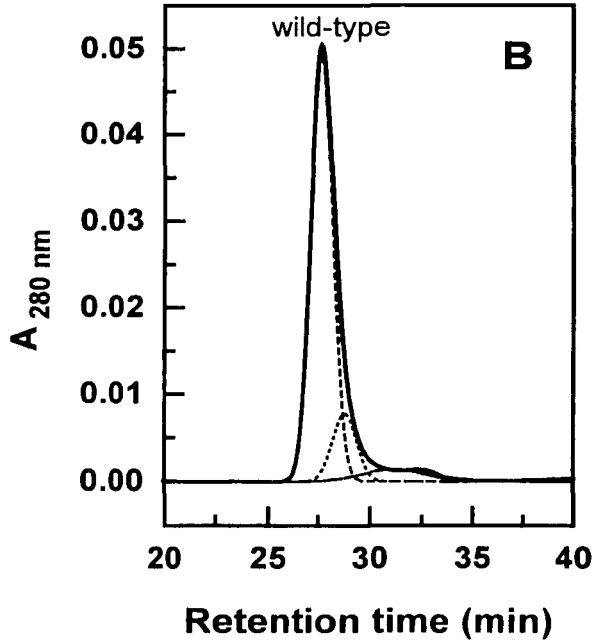
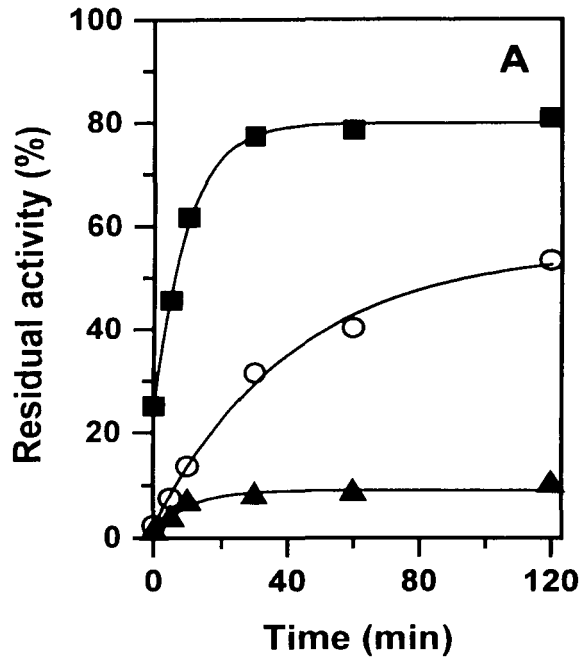


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

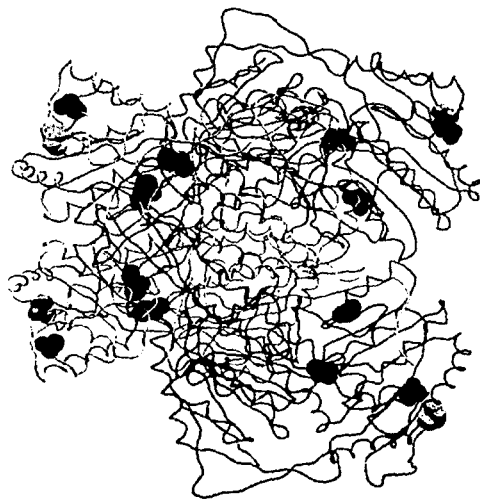


TRIS CON
FALLA DE ORIGEN

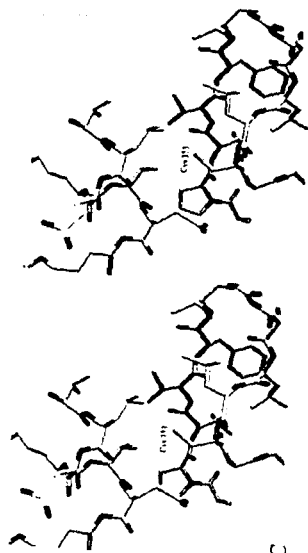




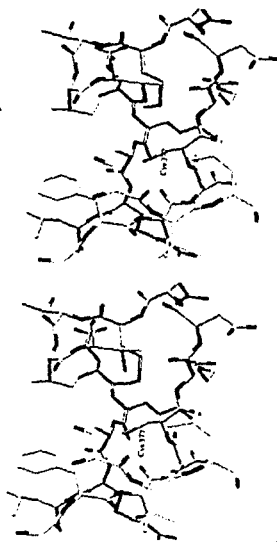
A



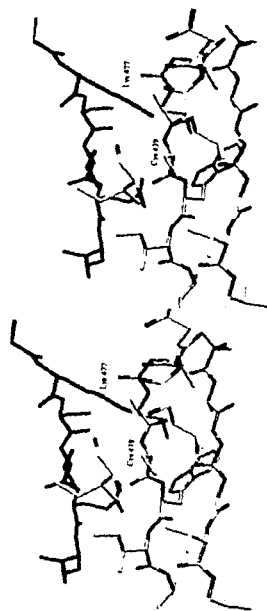
B



C



D



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, las conclusiones de este trabajo son:

- 1) La cisteína esencial de la BADH de *P. aeruginosa* es reactiva en un intervalo de pH muy amplio, lo cual posiblemente pueda deberse a la formación de un par iónico con un residuo cargado positivamente.
- 2) Los ligandos modulan la reactividad de la cisteína esencial.
- 3) Las cisteínas C353, C377 y C439 no están involucradas en catálisis o en la unión de los sustratos.
- 4) No existe una pareja de cisteínas vecinales en la BADH de *P. aeruginosa*.
- 5) Las cisteínas no esenciales no afectan la reactividad de la cisteína esencial, ni los cambios en reactividad provocados por la incubación con los nucleótidos.
- 6) La C439 se encuentra en la interfase monómero-monómero de una unidad dimérica y es un residuo importante para la estabilidad de la BADH de *P. aeruginosa*.

IX. PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha determinado la elevada reactividad del grupo tiol del residuo de cisteína esencial y su existencia como tiolato en un amplio intervalo de pH, pero queda por entender el mecanismo por el que se estabiliza el ión tiolato, lo que arrojaría información sobre el mecanismo químico de la reacción catalizada por esta enzima. Con este fin sería interesante obtener las mutantes de los residuos de la K96 y de la H333, alguno de los cuales podría estar involucrado en la formación de este par iónico, y del E252, propuesto en la activación de la cisteína esencial de otra ALDH, y determinar el efecto de estas mutaciones sobre la reactividad de la cisteína esencial.

Es también muy interesante determinar el mecanismo por el que se produce la modulación de la reactividad de la cisteína esencial por los ligandos, y determinar si existen o no dos formas en equilibrio de la enzima. Si este es el caso, conocer en que se diferencian.

Queda abierta la pregunta de por qué los reactivos para ditiolos producen una inactivación en nuestra enzima que no posee cisteínas vecinales.

En un futuro deberá hacerse un estudio por mutagénesis sitio-dirigida del papel de los residuos de aminoácidos que pueden ser importantes para la estabilidad de la estructura cuaternaria, como es el caso de la K477, un residuo altamente conservado tanto en las ALDHs como en las BADHs y que se encuentra en la interfase monómero-monómero de una unidad dimérica.

Finalmente, un objetivo que pretendemos abordar en forma inmediata es obtener la estructura tridimensional de la BADH de *P. aeruginosa*, la cual nos permitirá conocer la posición real de las cisteínas y de los residuos de aminoácidos que participan en la catálisis y en la estabilidad, así como las interacciones que se dan entre ellos.

X. REFERENCIAS

Abriola, D. P., MacKerell, A. D. y Pietruszko, R. (1990). Correlation of loss of activity of human aldehyde dehydrogenase with reaction of bromoacetophenone with glutamic acid-268 and cysteine-302 residues. Partial-sites reactivity of aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* **266**: 179-187.

Ahvazi, B., Coulombe, R., Delarge, M., Vedadi, M., Zhang, L., Meighen, E. y Vrielink, A. (2000). Crystal structure of the NADP⁺-dependent aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*: structural implications for cofactor specificity and affinity. *Biochem. J.* **349**: 853-861.

Ambroziak, W. y Pietruszko, R. (1991). Human aldehyde dehydrogenase: activity with aldehyde metabolites of monoamines, diamines and polyamines. *J. Biol. Chem.* **266**: 13011-13018.

Arakawa, K., Takabe, T., Sugiyama, T. y Akazawa, T. (1987). Purification of betaine aldehyde dehydrogenase from spinach leaves and preparation of its antibody. *J. Biochem.* **101**: 1485-1488.

Bagui, T. K., Gosh, M. y Datta, A. K. (1996). Two conformationally vicinal thiols at the active site of *Leishmania donovani* adenosine kinase. *Biochem. J.* **316**: 439-445.

Barret, W. C., DeGnore, J. P., Keng, Y., Zhang, Z., Yim, M. B. y Chock, P. B. (1999). Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **274**: 34543-34546.

Bednar, R. A. (1990). Reactivity and pH dependence of thiol conjugation to *N*-ethylmaleimide: detection of a conformational change in chalcone isomerase. *Biochemistry* **29**: 3684-3690.

Bergen, G. A., y Shelhamer, J. H. (1996). Pulmonary infiltrates in the cancer patient. New approaches to an old problem. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **10**: 297-325.

Bernard, T., Pocard, J-A, Perroud, B. y Le Rudulier, D. (1986). Variations in the response of salt-stressed *Rhizobium* strains to betaines. *Arch. Microbiol.* **143**: 359-364.

Biggers, J. D.; Lawitts, J. A. y Lechene, C. P. (1993). The protective action of betaine on the deleterious effects of NaCl on preimplantation mouse embryos *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* **34**: 380-390.

Blatter, E., Abriola, D. y Pietruszko, R. (1992). Aldehyde dehydrogenase. Covalent intermediate in aldehyde dehydrogenation and ester hydrolysis. *Biochem. J.* **282**: 353-360.

Boch, J., Kempf, S. 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.

Bradbury, S. L. y Jakoby, W. B. (1971). Ordered binding of substrates to yeast aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **246**: 1834-1840.

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/StudentPseudomonas

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

Chaparian, M. G. y Evans, D. R. (1991). The catalytic mechanism of the amidotransferase domain of the syrian hamster multifunctional protein CAD. Evidence for a CAD-glutamyl covalent intermediate in the formation of carbamyl phosphate. *J. Biol. Chem.* **266**: 3387-3395.

Chern, M. K. y Pietruszko, R. (1995). Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase. *Biochemistry* **31**: 12532-12535.

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.

Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Azza, S., Branlant, G. y Aubry, A. (1999). Apo and holo crystal structures of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* **290**: 161-173.

Cobessi, D., Tête-Favier, F., Marchal, S., Branlant, G. y Aubry, A. (2000). Structural and biochemical investigations of the catalytic mechanism of an NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* **300**: 141-152.

Denu, J. M., Stuckey, J. A., Saper, M. A. y Dixon, J. E. (1996). Form and function in protein desphosphorylation. *Cell* **87**: 361-364.

Denu, J. M. y Tanner, K. G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* **37**: 5633-5642.

Dickinson, F. M. y Hywood, G.W. (1987). The role of the metal ion in the mechanism of the K⁺ activated aldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.*: **247**: 377-384.

Domenech, E. C., Garrido, N. M. y Lisa, A. T. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 569-606.

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

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

Du Vigneaud V., Simmonds, S., Chandler, J. P. y Cohn, M. (1946). A further investigation of the role of betaine in transmethylation reactions *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **165**: 639-648.

Ellman, G. (1959). Tissue Sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**: 70-77.

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 Strom, A. R. (1990). Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1034**: 253-259.

Farrés, J., Wang, T., Cunningham, 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.

Fersht, A. (1999). Enzyme structure and mechanism. W. H. Freeman and company. New York, pp. 77-88.

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.

Figuroa-Soto, C. G. y Valenzuela-Soto, E. M. (2001). Purification of a heterodimeric betaine aldehyde dehydrogenase from wild amaranth plants subjected to water deficit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 1052-1058.

Fluharty, A. L. y Sanadi, D. R. (1961). On the mechanism of oxidative phosphorylation. II. Effects of arsenite alone and in combination with 2,3-dimercaptopropanol. *J. Biol. Chem.* **236**: 2772-2778.

Gan, Z. R., Sardana, M. K., Jacobs, J. W. y Polokoff, M. A. (1990). Yeast thioltransferase the active site cysteines display differential reactivity. *Arch. Biochem. Biophys.* **282**: 110-115.

Gerber, J. y Lill, R. (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* **2**: 71-86.

Gladysheva, T., Liu, J. y Rosen, B. P. (1996). His-8 lowers the pK_a of the essential Cys-12 residue of the ArsC arsenate reductase of plasmid R773. *J. Biol. Chem.* **271**: 33526-33260.

González-Segura, L. (1999). Papel de las cisteínas en la actividad de la betaina aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 70-77.

González-Segura, L., Velasco-García, R. y Muñoz-Clares, R. A. (2002). Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **361**: 577-585.

Govan, J. R. W. y Deretic, V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* **60**: 539-574.

Graham, W. D. (1951). *In vitro* inhibition of liver aldehyde dehydrogenase by tetraethylthiuram disulphide. *J. Pharm. Pharmacol.* **3**: 160-168.

Griffiths, S. W., King, J. y Cooney, C. L. (2002). The reactivity and oxidation pathway of cysteine 232 in recombinant human α 1-antitrypsin. *J. Biol. Chem.* **277**: 25486-25492.

Guzmán-Partida, A. M. y Valenzuela-Soto, E. M. (1998). Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* **119**: 485-491.

Habeeb, A. F. S. A. (1972). Reaction of protein sulfhydryl groups with Ellman's reagent. En *Methods in enzymology*. Hirs, C. H. W. and Timashff, S. N. (eds), Academic Press, New York, Vol. 25. pags.457-464.

Hald, J. Jacobsen, E. y Larsen, V. (1948). The sensitizing effect of tetraethylthiuramdisulphide (Antabuse) to ethylalcohol. *Acta Pharmacol.* **4**: 285-296.

Hempel, J. y Pietruszko, R. (1981). Selective chemical modification of human liver aldehyde dehydrogenases E_1 and E_2 by iodoacetamide. *J. Biol. Chem.* **256**: 10889-10896.

Hempel, J., Pietruszko, R., Fietzek, P. y Jörnvall, H. (1982). Identification of a segment containing a reactive cysteine residue in human liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase (isoenzyme E_1). *Biochemistry* **21**: 6834-6838.

Hempel, J., Nicholas, H. y Jörnvall, H. (1991). Thiol proteases and aldehyde dehydrogenases: evolution from a common thiolesterase precursor? *Proteins Struct. Funct. Genet.* **11**: 176-183.

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

Hill, J. P., Motion, R. L., Buckley, P. D. y Blackwell, L. F. (1994). The effect of *p*-(chloromercuri)benzoate modification of cytosolic aldehyde dehydrogenase from sheep liver. Evidence for a second aldehyde binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* **310**: 256-263.

Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**: 13963-13966.

Hunt, J. C. y Phibbs, P. V. Jr. (1983). Regulation of alternate peripheral pathways of glucose catabolism during aerobic and anaerobic growth of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **154**: 793-802.

Iglesias, A. A., Serrano, A., Guerrero, M. G. y Losada, M. (1987). Purification and properties of NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the green alga *Clamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* **925**: 1-10.

Iglesias, A. A. y Losada, M. (1988). Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **260**: 830-840.

Imhoff, J. F. y Rodríguez-Valera (1984). Betaine is the main compatible solute of halophilic eubacteria. *J. Bacteriol.* **160**: 478-479.

Imoto, T. y Yamada, H. (1989). Chemical modification. En: Creighton T. E. *Protein function. A practical approach.* Oirl Press IRL Press Oxford University Press. págs. 247-277.

Ishitani, M., Nakamura, T., Han, S. Y. y 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.

Jakoby, W.B. (1958). Aldehyde oxidation. II. Evidence for closely juxtaposed sulfhydryl groups on dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **232**: 89-97.

Jez, J. M. y Noel, J. P. (2000). Mechanism of chalcone synthase. pK_a of the catalytic cysteine and the role of the conserved histidine in a plant polyketide synthase. *J. Biol. Chem.* **275**: 39640-39646.

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 Sci.* **7**: 2106-2117.

Kang, S. W., Baines, I. C., Rhee, S. G. (1998). Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J. Biol. Chem.* **273**: 6303-6311.

Kice, J. L. (1980). Mechanism and reactivity in reactions of organic oxyacids of sulfur and their anhydrides. *Adv. Phys. Org. Chem.* **17**: 65-181.

Kitson, T. (1977). The disulfiram-ethanol reaction. A review, *J. Stud. Alcohol* **202**: 96-113.

Kitson, T., Hill, J. y Midwinter, G. (1991). Identification of a catalytically essential nucleophilic residue in sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* **275**: 207-210.

Kobashi, K. (1968). Catalytic oxidation of sulfhydryl groups by β -phenantroline copper complex. *Biochim. Biophys. Acta* **158**:239-245.

Kortemme, T., y Creighton, T. E. (1995). Ionisation of cysteine residues at the termini of model α -helical peptides. Relevance to unusual thiol pK_a values in proteins of the thioredoxin family. *J. Mol. Biol.* **253**: 799-812.

Kosower, N. S., Kosower, E. H., Wertheim, B. y Correa, W. (1969). Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **37**: 593-596.

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

Kurys, G., Shah, P. C., Kikonyogo, A., Reed, D., Ambroziak, W. y Pietruszko, 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.

Lam, J. P., Mays, D. C. and Lipsky, J. J. (1997). Inhibition of recombinant human mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases by two candidates for the active metabolites of disulfiram. *Biochemistry* **36**: 13748-13754.

Lamb, A. L. y Newcomer, M. E. (1999). The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å resolution: implications for retinal specificity. *Biochemistry* **38**: 6003-6011.

Lammark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J. y Strom, A. R. (1991). DNA sequence and analysis of the *bet* genes encoding the osmoregulatory choline-glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 849-855.

Landfald, B. and Strom, A. R. (1986). Choline-Glycine betaine pathway confers a high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 849-855.

Legaria, J., Rajsbaum, R. Muñoz-Clares, R. A., Villegas-Sepúlveda, N., Simpson, J. e 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.

Le Rudulier, D. y Bouillard, L. (1983). Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae*: enhancement of anaerobic growth and nitrogen fixation under stress by proline betaine, γ -butyrobetaine, and other related compounds. *Can. J. Microbiol.* **30**: 299-305.

Le Rudulier, D., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T. y Valentine, R. C. (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science* **224**: 1064-1068.

Lewis S D, Johnson F A, y Shafer J A (1976). Potentiometric determination of ionizations at the active site of papain. *Biochemistry* **15**: 5009-5017.

Lipsky, J. J., Shen, M. L. y Naylor, S. (2001). Overview-*in vitro* inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**: 81-91.

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, Zhi-Jie, Sun, Yuh-Ju, Rose, J., Chung, Yong-Je, Hsiao, Chwan-Deng, Chang, Wen-Rui, Kuo, I., Perozich, J., Lindhahl, R., Hempel, J. y Wang, Bi-Cheng. (1997). The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struc. Biol.* **4**: 317-326.

Lo Bello, M., Parker, M. W., Desideri, A. Polticelli, F. Falconi, M., Del Boccio, G., Pennelli, A., Federici, G. y Ricci, G. (1993). Peculiar spectroscopic and kinetic properties of Cys-47 in human placental glutathione transferase. *J. Biol. Chem.* **268**: 19033-19038.

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. *FEBS Lett.* **57**: 335-338.

Lundbald, R. L. (1995). Techniques in protein modification. CRC Press. Corporate Blvd., N.W., Boca Raton, Florida. págs. 63-89

MacKerell, A. D., Vallari, R. C. y Pietruszko, R. (1985). Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase inhibition by diethylthiocarbamic acid methanethiol mixed disulfide: a derivative of disulfiram. *FEBS Lett.* **179**: 77-81.

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

Marchal, S., Cobessi, D., Rahuel-Clermont, S., Tête-Favier, F., Aubry, A. y Branlant, G. (2001). Chemical mechanism and substrate binding sites of NADP-dependent aldehyde dehydrogenase from *Streptococcus mutans*. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**: 15-28.

Maurer, H. R. (2001). Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1234-1245.

Mays, D. C., Nelson, A. N., Fauq, A. H., Shriver, Z. H., Veverka, K. A., Naylor, S. y Lipsky, J. (1995). *S*-methyl *N, N*-diethylthiocarbamate sulfone, a potential metabolite of disulfiram and potent inhibitor of low K_m mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* **49**: 693-700.

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

Miranda, J. J. L. (2003). Position-dependent interactions between cysteine residues and the helix dipole. *Protein Sci.* **12**: 73-81.

Miseta, A. y Csutora, P. (2000). Relationship between the occurrence of cysteine in proteins and the complexity of organisms. *Mol. Biol. Evol.* **17**: 1232-1239.

Montero, M. G., Alvarez, A. L. I. y Lara, G. S. (2001). La modificación química de las enzimas ¿Un enfoque experimental anticuado?. *BEB* **20**: 30-38.

Moore, S. A., Baker, H. M., Blythe, T. J., Kitson, T. M. y Baker, E. N. (1998). Sheep liver cytosolic aldehyde dehydrogenase: the structure reveals the basis for the retinal specificity of class 1 aldehyde dehydrogenases. *Structure* **6**: 1541-1551.

Mori, N., Kawakami, B., Hyakutomi, K., Tani, Y. y Yamada, H. (1980). Characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Cylindrocarpum 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.

Mori, N., Fuchigami, S. y Kitamoto, Y. (2002). Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase with high affinity for NADP from *Arthrobacter globiformis*. *J. Biosci. Bioeng.* **93**: 130-135.

Muñoz-Clares, R. A., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C. y Contreras-Díaz, L. (2003). Ligand-induced conformational changes of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves affecting the reactivity of the catalytic thiol. *Chem. Biol. Interact.* **143-144**:129-137.

Myhre, G., Floyd, B. N. I., Mays, D. C., Macomber, D. W. y Lipsky, J. J. (2001). Selectivity of disulfiram and its metabolites for human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *FASEB J.* **15**: A919-A919.

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.* **39**: 1513-1514.

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

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

Pan, S-M., Moreau, R. A., Yu, C. y Huang, A. H. (1981). Betaine accumulation and betaine-aldehyde dehydrogenase in spinach leaves. *Plant Physiol.* **67**: 1105-1108.

Parente, A., Merrifield, B., Geraci, G. y D'Alessio, G. (1985). Molecular basis of superreactivity of cysteine residues 31 and 32 of seminal ribonuclease. *Biochemistry* **24**: 1098-1104.

Pepsin, S. R. y Candia, O. A. (1982). Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **22**: 621-629.

Petronini, PGM., de Angelis, E., Borghetti, P., Borghetti, AF. y Wheelers, KP. (1992). Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. *Biochem. J.* **282**: 69-73.

Pier, G. B. (1985). Pulmonary disease associated with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: current status of the host-bacterium interaction. *J. Infect. Dis.* **151**: 575-580.

Polgár, L. (1973). On the mode of activation of the catalytically essential sulfhydryl group of papain. *Eur. J. Biochem.* **33**: 104-109.

Polgár, L. (1973). Ion-pair formation as a source of enhanced reactivity of the essential thiol group of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **51**: 63-71.

Polgár, L. y Halasz, P. (1973). On the reactivity of the thiol group of thiosubtilisin. *Eur. J. Biochem.* **39**: 421-429.

Polgár, L. (1974). Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis. *FEBS Lett.* **47**(1): 15-18.

Polgár, L. y Csoma, C. (1987). Dissociation of ionizing groups in the binding cleft inversely controls the endo- and exopeptidase activities of cathepsin B. *J. Biol. Chem.* **262**: 14448-14453.

Poole, L. B. y Claiborne, A. (1989). The Non-flavin redox center of the Streptococcal NADH peroxidase. II. Evidence for a stabilized cysteine-sulfenic acid. *J. Biol. Chem.* **264**: 12330-12338.

Pruitt, B. A. (1980). Infections of burns other wounds caused by *Pseudomonas aeruginosa*. En Sabath, L. D. (de.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber. Bern Stuttgart Vienna, págs. 55-70.

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

Reynolds, H. Y. y Fick, R. N. (1980). *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections, (emphasizing nosocomial pneumonia and respirator infections in cystic fibrosis). En: Sabath, L. D. (de.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber. Bern Stuttgart Vienna, págs. 71-88.

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

Rivett, A. J. y Tipton, K. F. (1981). Kinetics studies with rat-brain succinic-semialdehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* **117**: 187-193.

Roberts, D. D., Lewis, S. D., Ballou, D. P., Olson, S. T. y Shafer, J. A. (1986). Reactivity of small thiolate anions and cysteine-25 in papain toward methyl methanethiosulfonate. *Biochemistry* **25**: 5595-5601.

Robertus, J. D., Kraut, J., Alden, R. A. y Birktoft, J. J. (1972). Subtilisin; a stereochemical mechanism involving transition-state stabilization. *Biochemistry* **11**: 4302-

Rodríguez-Zavala, J. S. y Weiner, H. (2001). Role of the C-terminal tail on the quaternary structure of aldehyde dehydrogenases. *Chem. Biol. Interact.* **130-132**: 151-160.

Rodríguez-Zavala, J. S. y Weiner, H. (2002). Structural aspects of aldehyde dehydrogenase that influence dimer-tetramer formation. *Biochemistry* **41**: 8229-8237.

Ryzewski, C. N. y Pietruszko, R. (1980). Kinetic studies of horse liver alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* **19**: 4843-4848.

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* PAO1. *Mol. Microbiol.* **23**: 43-56.

Sárkány, Z., Skern, T. y Polgár, L. (2000). Characterization of the active site thiol group of rhinovirus 2A proteinase. *FEBS Lett.* **481**: 289-292.

Schwabe, J. W. R. y Klung, A. (1994). Zinc mining for protein domains. *Nature. Struct. Biol.* **1**: 345-349.

Sheikh, S., Li, N., Hurley, T. D. y Weiner, H. (1997). The potential roles of the conserved amino acids in human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **272**: 18817-18882.

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, D. J., Maggio, E. T. y Lenyon, G. L. (1975). Simple alkanethiol groups for temporary blocking of sulfhydryl groups of enzymes. *Biochemistry* **14**: 766-771.

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.

Soukri, A., Mougin, A., Corbier, C., Wonacott, A. J. y Branlant, G. (1989). Role of histidine 176 residue in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* **28**: 2586-2592.

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

Stocken, L. A. (1947). 2, 3-Dimercaptopropanol ("British Anti-Lewisite") and related compounds. *J. Chem. Soc.*: 592-595.

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

Styvold, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B. Eshoo, M. W., Bjornsen, T. y Strom, 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.

Takahashi, K. y Weiner, H. (1980). Magnesium stimulation of catalytic activity of horse liver aldehyde dehydrogenase. Changes in molecular weight and catalytic sites. *J. Biol. Chem.* **255**: 8206-8209.

Talfournier, F., Colloc'h, N., Mornon, J. y Branlant, G. (1998). Comparative study of the catalytic domain of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from bacteria and archae via essential cysteine probes and site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **252**: 447-457.

Talfournier, F., Colloc'h, N., Mornon, J. y Branlant, G. (1999). Functional characterization of the phosphorylating D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases from the archaeon *Methanothermus fervidus* by comparative molecular modeling and site-directed mutagenesis. *Eur. J. Biochem.* **265**: 93-104.

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.

Trossat, C., Nolte, K. D. y Hanson, A. D. (1996). Evidence that the pathway of dimethylsulfoniopropionate biosynthesis begins in the cytosol and ends in the chloroplast. *Plant. Physiol.* **111**: 965-973.

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.

Tu, G. C. y Weiner, H. (1988a). Identification of the cysteine residue in the active site of horse liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **263**: 1212-1217.

Tu, G. C. y Weiner, H. (1988b). Evidence for two distinct active sites on aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **263**: 1218-1222.

Vaca, P. S. y Cervantes-Vega, C. (1988). Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **30**: 87-90.

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

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

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

Vallari, C. R. y Pietruszko, R. (1982). Human Aldehyde Dehydrogenase: Mechanism of inhibition by disulfiram. *Science* **216**: 637-639.

Vedadi, M., Szittner, R., Smillie, L. y Meighen, E. (1995). Involvement of cysteine 289 in the catalytic activity of an NADP⁺-specific fatty aldehyde dehydrogenase from *Vibrio harveyi*. *Biochemistry* **34**: 16725-16732.

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. Commun.* **238**: 448-451.

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

Velasco-García, R., González-Segura, L. y Muñoz-Clares, R. A. (2000). Steady-state kinetic mechanism of the NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalysed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. J.* **352**: 675-683.

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

Vojtechová, M., Hanson, A. D. y Muñoz-Clares, R. A. (1997). Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to methylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**: 81-88.

Vojtechová, M., Hanson, A. D. y Muñoz-Clares, R. A. (1997b). Betaine aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyzes the NAD⁺-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. *Arch. Biochem. Biophys.* **337**: 81-88.

Von Bahr-Lindström, H., Jeck, R., Woenckhaus, C., Sohn, S., Hempel, J., y Jörnvall, H. (1985). Characterization of the coenzyme binding site of liver aldehyde dehydrogenase: differential reactivity of coenzyme analogues. *Biochemistry* **24**: 5847-5851.

Wang, P. F., McLeish, M. J., Kneen, M. M., Lee, G. y Kenyon, G. L. (2001). An unusually low pK_a for Cys282 in the active site of human muscle creatine kinase. *Biochemistry* **40**: 11698-11705.

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.

Watt, W., Koeplinger, K. A., Mildner, A. M., Heinrikson, R. L., Tomasselli, A. G. y Watenpaugh, K. D. (1999). The atomic-resolution structure of human caspase-8, a key activator of apoptosis. *Structure* **7**: 1135-1143.

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. En: 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.

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 Clemens, J. A. (1987). Metabolism and turnover of lung surfactant. *Am. Rev. Respir. Dis.* **136**: 426-444.

Wyn Jones, R.G. y Storey, R. (1981). Betaines. En *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*. ed. L. G. Paleg, D. Aspinall. Sydney: Academic. págs 171-204.

Yamanaka, Y., Kazuoka, T., Yoshida, M., Yamanaka, K., Oikawa, T y Soda, K. (2002). Thermostable aldehyde dehydrogenase from psychrophile, *Cytophaga* sp. KUC-1: enzymological characteristics and functional properties. *Biophys. Res. Commun.* **298**: 632-637.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. y Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222.

APÉNDICE A (Artículo de revisión)

Papel de los residuos de cisteína en la estructura y función de las proteínas

Faint, illegible text at the top of the page, possibly a header or title.

Second line of faint, illegible text.

Third line of faint, illegible text.

Fourth line of faint, illegible text.

Fifth line of faint, illegible text.

Sixth line of faint, illegible text.

Seventh line of faint, illegible text.

Eighth line of faint, illegible text.

Ninth line of faint, illegible text.

Tenth line of faint, illegible text.

Eleventh line of faint, illegible text.

Twelfth line of faint, illegible text.

Thirteenth line of faint, illegible text.

Fourteenth line of faint, illegible text.

Fifteenth line of faint, illegible text.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

EL PAPEL DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LA ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS*

LILIAN GONZÁLEZ-SEGURA^{1,2} Y ROSARIO A. MUÑOZ-CLARES²

RESUMEN

La cisteína es uno de los residuos de aminoácidos menos abundante en las proteínas. A pesar de ello, la gran capacidad del grupo tiol de su cadena lateral de pasar del estado reducido a diferentes estados oxidados, le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas. Así, los residuos de cisteína juegan un papel importante en la estabilidad, en el plegamiento, en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica. Esta revisión presenta un panorama general de estos papeles y de las diferentes formas en las cuales se pueden encontrar los residuos de cisteína de acuerdo a la función que estén llevando a cabo.

PALABRAS CLAVE: Tiol, tiolato, puente disulfuro, ácido sulfénico, *S*-nitrosilación, *S*-tiolación.

ABSTRACT

Cysteine is among the least abundant amino acid residues found in proteins. In spite of this, their great capacity for being oxidized to different states allows these residues to participate in many aspects of protein structure and function. Cysteine residues thus play important roles in protein stability, folding, metal binding, enzymatic catalysis and regulation of protein activity. This review presents a general view of the roles and different form of these residues in proteins, according to the function carried out.

KEY WORDS: Thiol, thiolate, disulfide bridge, sulfenic acid, *S*-nitrosylation, *S*-thiolation.

INTRODUCCIÓN

Se ha observado que la cisteína (Fig. 1) es uno de los residuos de aminoácidos menos abundantes en las proteínas, con un porcentaje menor al 3 %. Sin embargo, a pesar de su abundancia relativamente baja, la capacidad del grupo tiol para donar electrones y para oscilar entre un estado reducido (-SH) y diversos estados oxidados, le permite a este residuo participar en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas. Así, los residuos de cisteína juegan un papel importante en la estabilidad, en el plegamiento, en la unión

de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad proteica.

Los diferentes estados de oxidación del grupo tiol de los residuos de cisteína son el ácido sulfénico (-SOH), el ácido sulfínico (-SO₂H), el ácido sulfónico (-SO₃H) y el puente disulfuro (-S-S-). Tanto la oxidación a ácido sulfénico como la que lleva la formación de un puente disulfuro entre dos residuos de cisteína, son reversibles por agentes reductores, mientras que los otros dos estados de oxidación, ácidos sulfínico y sulfónico, no pueden ser reduci-

dos a cisteína (Fig. 2). El ácido sulfénico es muy inestable y, si no se encuentra en un ambiente apropiado que lo proteja de la oxidación posterior, fácilmente se oxida irreversiblemente a sulfínico o sulfónico, o forma un puente disulfuro si está cercano a otro tiol (1).

PARTICIPACIÓN DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LA ESTABILIDAD Y EL PLEGAMIENTO DE LAS PROTEÍNAS

La cisteína es un aminoácido que posee un grupo tiol muy reactivo, que no se ioniza a pH fisiológico y que forma puentes de hidrógeno re-

* Recibido: 10 de diciembre de 2002. Aceptado: 11 de marzo de 2003

¹ Laboratorio de Osmorregulación, F. E. S. Iztacala., Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios No. 1, Tlalnepantla, Estado de México, 54090, México y ²Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., 04510, México. Tel. 5622-52-76, Fax 5622-53-29. Correo E:liliang@servidor.unam.mx.

lativamente débiles, por lo que no contribuye significativamente a la estabilidad de las proteínas por medio de enlaces salinos o de puentes de hidrógeno. No obstante, si los grupos tiol de dos residuos de cisteína de la misma cadena o de cadenas polipeptídicas diferentes están próximos y en la orientación adecuada, pueden unirse por oxidación formando un puente disulfuro, que es un enlace covalente fuerte. Estos enlaces estabilizan la estructura nativa de la proteína, haciéndola menos susceptible a la degradación por proteasas y disminuyendo el número de las conformaciones desplegadas posibles características del estado desnaturalizado, el cual al disminuir de esta forma su entropía conformacional resulta energéticamente más difícil de alcanzar.

El papel de los residuos de cisteína en la estabilización de la estructura nativa de una proteína depende de la localización de esta última. Puesto que bajo condiciones normales el ambiente en el interior de las células es altamente reductor, las proteínas intracelulares no dependen de puentes disulfuro para estabilizar su conformación nativa. Por el contrario, si éstos llegan a formarse bajo una condición de estrés oxidativo, generalmente se altera la estructura nativa de tal forma que se pierde la función de la proteína. El mantenimiento de los grupos -SH de las proteínas intracelulares en su forma reducida se lleva a cabo por tiorredoxinas y glutatión, de los que hablaremos más adelante. En el caso de las proteínas extracelulares, sin embargo, algunos residuos de cisteína forman frecuentemente puentes disulfuro, confiriendo una estabilidad adicional a la proteína en cuestión que le permite enfrentar ambientes con condiciones más extremas que las intracelulares.

En las células eucariontes, la for-

mación de un puente disulfuro en las proteínas nacientes que van a ser exportadas ocurre en el retículo endoplásmico (RE), proceso que es simultáneo a la traducción y que tiene un impacto importante en el plegamiento correcto de la proteína. El plegamiento incorrecto de las proteínas produce su retención en el RE y su posterior degradación. En el lumen del RE, todas las células poseen la enzima llamada proteína disulfuro isomerasa (PDI), perteneciente a la superfamilia de las tiorredoxinas, que ayuda al plegamiento correcto de los polipéptidos que poseen puentes disulfuro. La PDI cataliza reacciones de intercambio tioldisulfuro, que incluyen la formación, reducción e isomerización de puentes disulfuro (2). La actividad de oxidorreductasa de la PDI, por la cual realiza el rearrreglo de los puentes disulfuro, depende de un par de residuos de cisteína de su sitio activo, en el motivo CXXC característico de toda la familia de tioldisulfuro oxidorreductasas (3),

que forman un puente disulfuro y que participan en la oxidación de las proteínas que se pliegan, como se muestra en la figura 3. El proceso de isomerización involucra ciclos sucesivos de oxidación y reducción hasta que, por ensayo y error, se llega a la formación de los disulfuros nativos, que son resistentes a una posterior isomerización por ser inaccesibles. La PDI discrimina entre los puentes disulfuro nativos y no nativos, de manera que isomeriza sólo los últimos. La formación de puentes disulfuro en células eucarióticas requiere, además, de otra proteína denominada Ero1p. Ésta es una glicoproteína asociada a la membrana del RE que introduce, en el lumen de este último, los equivalentes de oxidación necesarios para la formación de un puente disulfuro. La PDI se oxida a través de un intercambio ditiol-disulfuro con la Ero1p, que queda reducida. Se desconoce la proteína que lleva a cabo la regeneración del estado oxidado al reducido de la Ero1p (4).

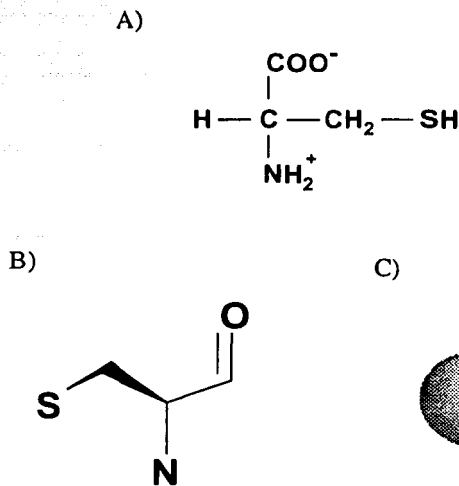


Figura 1. Estructura química (A) y modelo de la cisteína (B) y (C). En C) los carbonos están representados por esferas blancas, el oxígeno por la esfera negra, el azufre por la gris clara y el nitrógeno por la gris oscura.

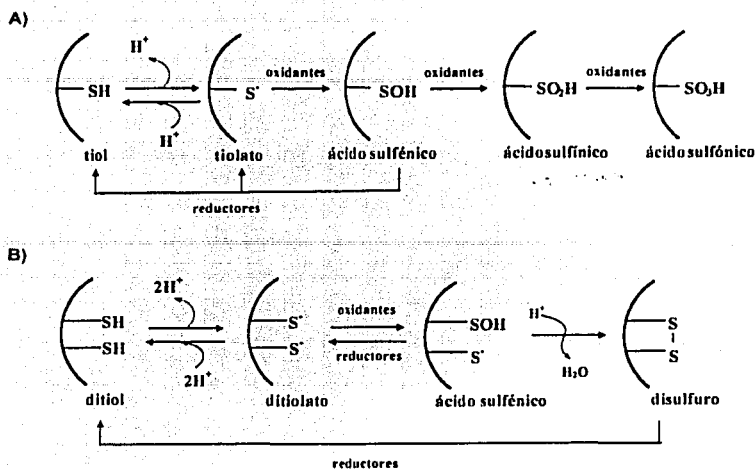


Figura 2. Estados de oxidación del grupo tiol de la cisteína.

En procariontes, la formación de los puentes disulfuro ocurre en el periplasma, mediante un proceso semejante al descrito en eucariontes (5). La contraparte de la PDI es el sistema Dsb (el sistema de formación de puentes disulfuro), el cual consiste de por lo menos seis proteínas redox pertenecientes también a la superfamilia de las tiorredoxinas: DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, DsbE y DsbG. De ellas, la DsbA y la DsbB son las equivalentes a la PDI y la Ero1p, respectivamente, sólo que en el caso de la DsbA su única función es la formación de puentes disulfuro, por lo que requiere de otra proteína que actúe como disulfuro isomerasa, que es la DsbC. La DsbD mantiene el estado reducido de la DsbC. La DsbE probablemente está involucrada en la transferencia de electrones para la maduración del citocromo *c* en el periplasma de *Escherichia coli*, aunque su función biológica permanece ambigua y su estructura no ha sido resuelta, y la DsbG funciona predominantemente como reductor o como catalizadora de la isomerización de disulfuros.

PARTICIPACIÓN DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN MECANISMOS DE REGULACIÓN

Como ya hemos mencionado, la oxidación de los residuos de cisteína generalmente produce pérdida de la función de las proteínas intracelulares. Sin embargo, existe un importante mecanismo de regulación de numerosos procesos celulares que se basa en modificación reversible por oxidación-reducción específica de residuos de cisteína de proteínas involucradas en la catálisis, la expresión génica, la transducción de señales, el plegamiento (chaperonas), etc. Estas modificaciones incluyen la formación y ruptura de puentes disulfuro, -ya sea de la misma proteína o de disulfuros mixtos con otro tiol como el glutatión-, la formación de ácido sulfénico, o la *S*-nitrosilación. Actualmente, este mecanismo de regulación por modificación covalente reversible se considera equiparable, en cuanto a su relevancia en el control biológico, a aquellos que implican otras modificaciones post-traduccionales como fosforilación, glicosilación o metilación.

Existen principalmente tres siste-

mas de regulación que involucran formación-ruptura de puentes disulfuro en las proteínas blanco: el sistema ferredoxina/tiorredoxina, el sistema NADP⁺/tiorredoxina y el sistema glutarredoxina. En estos sistemas las tiorredoxinas juegan un papel central.

Las tiorredoxinas son proteínas con una masa molecular de 12 kDa que se encuentran ampliamente distribuidas en animales, plantas y bacterias. El sitio activo de la tiorredoxina tiene dos residuos de cisteína en una secuencia altamente conservada [-Tyr-Cys-Gly/Ala-Pro-Cys-]. La forma oxidada de la tiorredoxina contiene un puente disulfuro que puede ser reducido a dos tioles por el sistema ferredoxina o por el sistema NADP⁺. Las tiorredoxinas reducidas son excelentes reductores de puentes disulfuro de proteínas, llevando a cabo esta reacción mucho más rápidamente, por varios órdenes de magnitud, que el glutatión (GSH), o que el ditiotretol (DTT), un agente no fisiológico reductor de tioles y disulfuros (6). El potencial de reducción estándar de la familia de las tiorredoxinas se encuentra en un intervalo de -0.124 a -0.270 V, siendo la tiorredoxina de *Escherichia coli* el miembro más reductor (-0.270 V). Por otra parte, los potenciales de reducción estándar del glutatión y del DTT son de -0.205 V y de -0.330 mV, respectivamente.

SISTEMA FERREDOXINA/TIORREDOXINA

El sistema ferredoxina/tiorredoxina consiste de tres componentes: la ferredoxina (Fd), la ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR), que es una proteína hierro-azufre, y la tiorredoxina. Este sistema funciona como un mecanismo general de regulación de enzimas mediado por luz en la fotosíntesis oxigénica, que está presente en cianobacterias, al-

gas eucaróticas y plantas superiores. Las enzimas blanco poseen un par de residuos de cisteína vecinales a la distancia y orientación correctas para formar un puente disulfuro. Durante el día, los electrones provenientes de la excitación de la clorofila se transfieren, vía Fd y una enzima hierro-azufre (la FTR), a una tiorredoxina, la que una vez reducida funciona en la reducción de la forma oxidada de la enzima blanco, llevándola de su forma inactiva con un puente disulfuro (-S-S-) a su forma activa con dos tioles (-SH)₂ (Fig. 4 A). Posteriormente, las enzimas activas son oxidadas y regresadas a su estado inactivo en la obscuridad (8).

SISTEMA NADP⁺/TIORREDOXINA

En el sistema NADP⁺/tiorredoxina la reducción de la tiorredoxina oxidada no se lleva a cabo por la ferredoxina sino por el NADPH, en una reacción catalizada por la NADP⁺-tiorredoxina reductasa (NTR), la cual contiene como grupo prostético el flavín adenín dinucleótido (FAD) (Fig. 4 B).

El sistema NADP⁺/tiorredoxina está presente en múltiples compartimentos celulares de una gran variedad de organismos, estando involucrado en procesos tales como el control de la división y proliferación celular, la acción hormonal, la replicación del ADN, la meiosis, el desarrollo embrionario temprano, la reparación y ensamble de proteínas y la germinación de semillas (9). La regulación por oxidación-reducción es un mecanismo general de control de los factores de transcripción como Fos, Jun y OxyR, los cuales requieren residuos de cisteínas libres para unirse al ADN.

El sistema NADP⁺/tiorredoxina reduce además específicamente una variedad de proteínas blanco que tienen puentes disulfuro intramoleculares, como es el caso de los inhibidores de α -amilasas y de tripsina, y de neuroto-

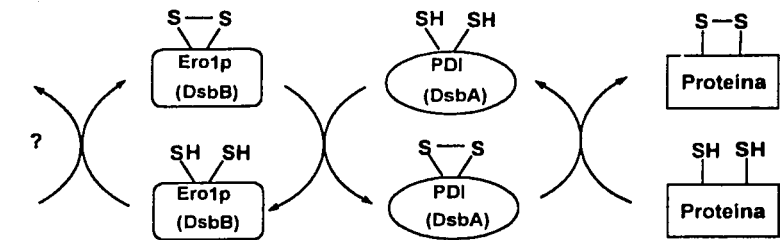


Figura 3. Modelo del mecanismo de acción de las proteínas disulfuro isomerasa (PDI) y Ero1p presentes en el retículo endoplásmico de eucariotes y de sus contrapartes de procariontes DsbA y DsbB (entre paréntesis).

xinas de diferentes venenos de víbora, escorpión y abeja. La reducción de los puentes disulfuro produce la inactivación de estas proteínas.

SISTEMA GLUTARREDOXINA

El sistema glutarredoxina consiste de las glutarredoxinas (Grx), la glutatión reductasa (GR) y el γ -glutamil-cisteinil-glicina, un tripéptido llamado comúnmente glutatión (GSH) (Fig. 4 C) (9). Las Grx son proteínas pequeñas que pertenecen a la superfamilia de las tiorredoxinas y que tienen la secuencia del par de residuos de cisteína del sitio activo característica de esta familia. Las Grx son el componente clave de este sistema, ya que pueden reducir disulfuros de proteínas directamente vía sus dos tioles del sitio activo, los cuales son convertidos a disulfuro (9). La regeneración de la Grx oxidada se lleva a cabo por el GSH.

El GSH está distribuido universalmente en bacterias, plantas y animales, y probablemente es el péptido simple más abundante. Su forma reducida (GSH) contiene un tiol funcional aportado por un residuo de cisteína. El GSH funciona como un agente reductor y su concentración en las células está en el intervalo de 1 a 10 mM. La forma oxidada (GSSG) consiste de dos moléculas de glutatión unidas por un puente disulfuro. La GR cataliza la reducción, dependiente de NADPH, de GSSG a

GSH. Para la transferencia de electrones, la GR usa FAD como grupo prostético, al igual que la NTR. Esta reacción es muy importante en los procesos metabólicos y normalmente produce una proporción de GSH:GSSG de más de 100:1, lo que permite al GSH funcionar como un agente reductor intracelular.

S-TIOLACIÓN

Las cisteínas son los residuos de las proteínas más fácilmente oxidados. Su oxidación puede resultar en entrecruzamiento intra o intermolecular, por formación de puentes disulfuro, e inactivación de proteínas, lo que finalmente conduce a la muerte celular. La oxidación irreversible de residuos de cisteína en las proteínas puede evitarse mediante una S-tiolación, un proceso mediante el cual los grupos tiol de la proteína forman disulfuros mixtos con tioles de bajo peso molecular como el GSH. La S-tiolación es una respuesta al estrés oxidativo que está fuertemente regulada por factores celulares aún desconocidos. Prueba de ello es que el tratamiento de las células con diferentes agentes oxidantes produce diferentes patrones de proteínas S-tioladas, a pesar de que las proteínas muestran la misma sensibilidad a estos agentes *in vitro*. La destiolación se lleva a cabo *in vivo* una vez que se supera el estrés oxidativo, por la acción de una glutarredoxina monotiol, que a dife-

rencia de las glutarredoxinas clásicas ya descritas contiene sólo un residuo de cisteína en su sitio activo (10).

S-NITROSILACIÓN

El óxido nítrico (NO) es una molécula la señal que regula muchos procesos biológicos a través de modular la actividad de una gran variedad de proteínas por medio de una reacción de S-nitrosilación de los residuos de cisteína de sus blancos. Los compuestos que llevan a cabo esta reacción son los productos de la oxidación del NO por el oxígeno molecular, el NO₂ y el N₂O₃. Otros mecanismos por el que los residuos de cisteína pueden nitrosilarse es por transferencia directa de un grupo NO desde otra proteína S-nitrosilada o de un nitrosol como el S-nitroglutathione (GSNO). Existen motivos consenso para la nitrosilación de residuos de cisteínas específicos. Tanto la nitrosilación como la desnitrosilación son reacciones no catalizadas por enzimas. La nitrosilación se favorece si el grupo tiol está en forma de tiolato o situado en un ambiente hidrofóbico. La desnitrosilación puede llevarse a cabo por reductores celulares, cambios en el pH o en la concentración de O₂, o por translocación de una proteína de un compartimento celular que permita un S-NO estable a otro que, por sus condiciones redox, favorezca la desnitrosilación. Por ejemplo, ciertas caspasas mitocondriales están normalmente inactivas por S-nitrosilación de su residuo catalítico de cisteína, pero se activan cuando se liberan al citoplasma, en respuesta a una señal apoptótica, y son desnitrosiladas, contribuyendo así al proceso de apoptosis (11).

PARTICIPACIÓN DE LOS RESIDUOS DE CISTEÍNA EN LA FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS

En el ambiente intracelular los residuos de cisteína de las proteínas jue-

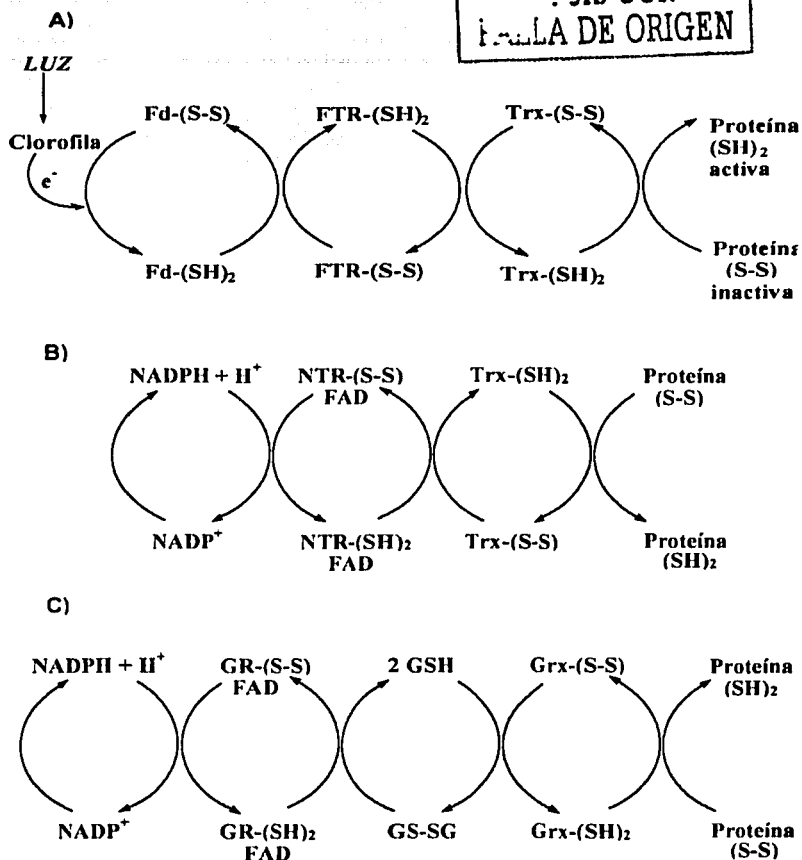


Figura 4. Representación esquemática de los sistemas de regulación: A) ferredoxina/tiorredoxina; B) NADPH+tiorredoxina y C) glutarredoxina. Fd: ferredoxina, FTR: ferredoxina-tiorredoxina reductasa, Trx: tiorredoxina, NTR: tiorredoxina reductasa, GR: glutathione reductasa, Grx: glutarredoxina. Figura modificada de Buchanan y col. (8) y Holmgren (9).

gan un papel funcional mas que estructural, participando en la unión de metales, en la catálisis enzimática y en la regulación de la actividad de enzimas o de otras proteínas involucradas en diversos procesos (tales como el ciclo celular, la acción hormonal, la replicación del ADN, la transcripción, la meiosis, el desarrollo embrionario temprano, la reparación y el ensamble de proteínas, la germinación de semillas, etc.), como acabamos de ver.

UNIÓN DE METALES

El grupo tiol de la cadena lateral de las cisteínas es excelente para unir metales, -particularmente el zinc-, por lo que estos residuos forman parte tanto de motivos estructurales conocidos como los dedos de zinc como del sitio activo de enzimas que usan este metal en su mecanismo catalítico.

Los dedos de zinc, cuya función es unir ADN y ARN, se encuentran en factores de transcripción de euca-

riones, en receptores hormonales nucleares, en enzimas del metabolismo de los ácidos nucleicos, como topoisomerasas, en otras enzimas como la proteína cinasa C, en la subunidad reguladora de la aspartato transcarbamilasa y en proteínas antivirales. Existen diferentes tipos de dedos de zinc, agrupados de acuerdo al residuo de cisteína o histidina y al número de estos residuos que intervienen en la unión del ion zinc (12).

Entre las enzimas que poseen residuos de cisteína en su sitio activo para unir un átomo de zinc se encuentran las metaloproteinasas de la matriz extracelular, que juegan un papel importante en la degradación tanto fisiológica como patológica de esta matriz. Una actividad incrementada de estas enzimas se produce en enfermedades como artritis, cáncer y esclerosis múltiple, por lo que son un blanco para el diseño de fármacos frente a estas enfermedades.

Residuos de cisteína también participan en la unión de las agrupaciones hierro-azufre (Fe-S), que son cofactores de proteínas que juegan importantes papeles en el metabolismo, la transferencia de electrones y la regulación de la expresión génica (13).

Finalmente, otro ejemplo de cómo

los residuos de cisteína pueden participar en la unión de metales es el de las metalotioneínas, proteínas pequeñas ricas en residuos de cisteína cuya biosíntesis está regulada por los niveles de exposición de un organismo a zinc, cobre, cadmio y otros metales pesados y cuya posible función es la desintoxicación de estos metales (14).

CATÁLISIS ENZIMÁTICA

En el sitio activo de algunas enzimas se encuentra un residuo de cisteína altamente reactivo responsable de la catálisis nucleofílica, en la que el sustrato es modificado por la formación de un enlace covalente con la enzima para dar un intermediario reactivo.

Los grupos nucleofílicos de las enzimas que comúnmente funcionan en la catálisis covalente son el grupo imidazol de los residuos de histidina, el grupo hidroxilo de los residuos de serina y el grupo tiol de los residuos de cisteína, que es el nucleófilo más potente de los tres. Enzimas conocidas que usan el grupo tiol de un residuo de cisteína en catálisis nucleofílica son: 1) las aldehído deshidrogenasas, que catalizan la oxidación irreversible de los aldehídos dependiente de NAD(P)⁺; 2) las tiol proteasas como la papaína y la brome-

laína, que prehidrolizan las proteínas y favorecen la digestión de las mismas; las caspasas, proteasas que juegan un papel fundamental en la apoptosis, y las catepsinas, proteasas funcionales en la respuesta inmune; 3) las carbamil fosfato sintetasas, que producen el carbamil fosfato utilizado en la síntesis de arginina y pirimidinas en los organismos superiores; 4) las peroxirredoxinas, enzimas que destruyen el peróxido de hidrógeno u otros peróxidos orgánicos reduciéndolos a agua o a su correspondiente alcohol, respectivamente, y que por tanto juegan un papel importante en la respuesta de las células a la estrés oxidativo; 5) las proteínas tirosín fosfatasas, que están involucradas en los mecanismos de transducción de señales; 6) las poliquétido sintetasas, que producen una serie de productos naturales que son usados como antibióticos, agentes anticancerígenos, etc.; y 7) las tiol:disulfuro oxidorreductasas, como las tioredoxinas, glutarredoxina, la FTR, la NTR, la GR, que, como hemos visto, participan en la regulación de la actividad de muchas proteínas intracelulares manteniendo o recuperando el estado reducido de sus cisteínas (Tabla I).

El mecanismo de catálisis de las aldehído deshidrogenasas, de las tiol

TABLA I

PROTEÍNAS QUE UTILIZAN AL TIOL DE UN RESIDUO DE CISTEÍNA COMO GRUPO NUCLEOFÍLICO

PROTEÍNAS	INTERMEDIARIO
Aldehído deshidrogenasas	Tiohemiacetal
Tiol proteasas	Tioéster
Carbamil fosfato sintetasas	Tioéster
Peroxirredoxinas (1 Cys)	Ácido sulfénico
Peroxirredoxinas (2 Cys)	Ácido sulfénico y disulfuro
NADH peroxidasas	Ácido sulfénico y disulfuro mixto
Proteín tirosín fosfatasas	Tiol-fosfato
Poliquétido sintetasas	Tioéster
Tiol:disulfuro oxidorreductasas*	Disulfuro mixto

* Incluyen: Ferredoxina-tiorredoxina reductasa, NADP⁺-tiorredoxina reductasa, glutatión reductasa, PDI, DsbA, tioredoxinas y glutarredoxinas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

proteasas y de las carbamil fosfato sintetasas consiste en la formación de un intermediario covalente, denominado acil enzima, que es resultado del ataque nucleofílico del grupo tiol del sitio activo sobre el carbono carbonilo del enlace susceptible -ya sea aldehído, amida o éster- del sustrato. El enlace covalente formado entre la enzima-sustrato (tioéster) es posteriormente hidrolizado para liberar los productos de la reacción, como se muestra esquemáticamente en las figuras 5 A y 5 B (15).

En realidad es el ion tiolato (S^-), no la forma tiol ($-SH$), la especie que es reactiva como nucleófilo, por lo que la reactividad del residuo de cisteína catalítico está determinada, además de por su accesibilidad al solvente, por la fracción del tiol que está presente en la forma de tiolato y por la reactividad intrínseca de este tiolato. Los dos últimos factores dependen de la basicidad del grupo tiol, es decir de su pK_a . El valor de pK_a del tiol del residuo de cisteína libre es de 8.9, y de ser éste el del residuo de cisteína catalítico, las enzimas mencionadas anteriormente no serían activas a valores de pH fisiológicos. Se requiere por lo tanto que el grupo tiol del residuo de cisteína del sitio activo sufra una activación inicial para que esté presente en la forma de tiolato. Esto implica que el ambiente del sitio activo esté diseñado de tal manera que la cisteína catalítica sea accesible y que su pK_a esté considerablemente disminuido. Los estudios de modificación química realizados con la papaína (16), revelaron que una forma de activación química del tiol del residuo de cisteína esencial es la formación de un par iónico con un residuo de un aminoácido cargado positivamente (histidina en este caso). Este mecanismo de activación del tiol catalítico se ha encontrado posteriormente en otras

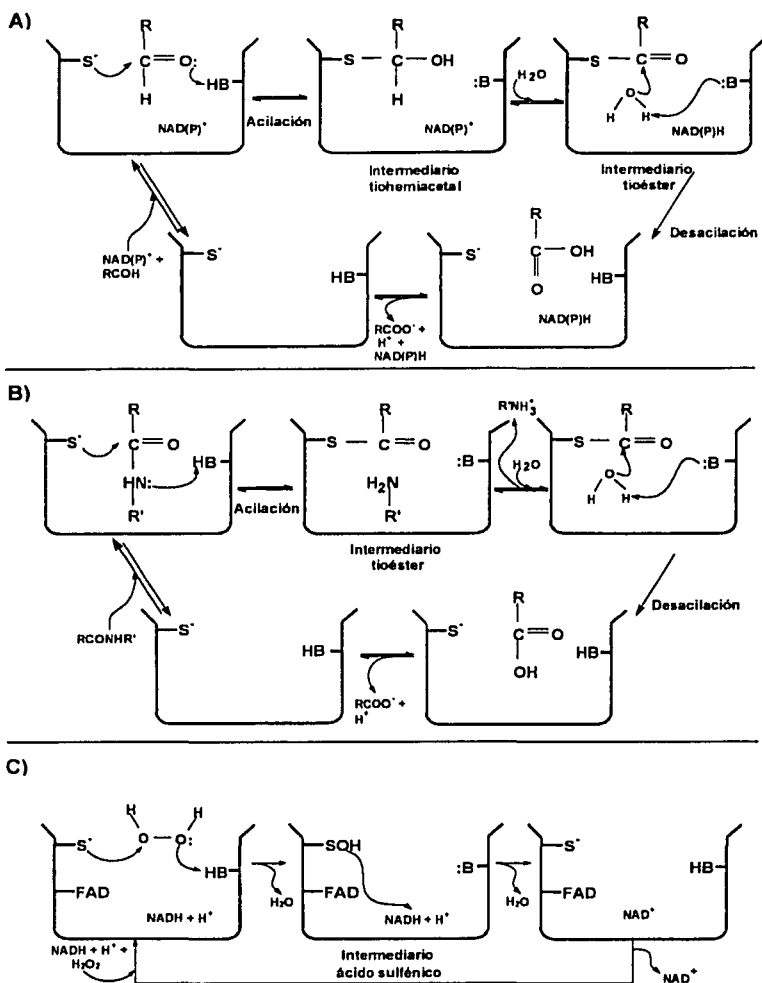


Figura 5. Mecanismo químico de reacción de las aldehído deshidrogenasas (A), de las tioester proteasas (B) y de la NADH peroxidasa (C). Figura modificada de Farrés y col. (15) y Yeh y col. (19).

enzimas, como la betaína aldehído deshidrogenasa (17). La formación de pares iónicos provoca así una disminución de varias unidades de pH en el pK_a del tiol y, por lo tanto, a los valores de pH del medio intracelular y extracelular el residuo de cisteína catalítica está mayoritariamente en forma de tiolato. La localización del residuo de cisteína nucleofílica en el extremo amino ter-

minal de una alfa hélice es otro mecanismo usado por las enzimas para disminuir su pK_a , ya que las cargas parciales positivas del dipolo-hélice estabilizan al tiolato. Otro mecanismo de activación de los residuos de cisteína catalítica, descrito en una aldehído deshidrogenasa, utiliza a un grupo carboxilo de un residuo de glutámico que toma el protón del tiol convirtiéndolo en tiolato (18).

En el caso de las peroxirredoxinas de una cisteína, el tiolato catalítico realiza un ataque nucleofílico sobre el peróxido, lo que resulta en la formación de ácido sulfénico (-SOH) en el sitio activo. El ácido sulfénico es muy inestable y ha de ser estabilizado, o de lo contrario se oxida rápida e irreversiblemente a sulfínico o sulfónico, lo que llevaría a la inactivación de la enzima. La estabilización del sulfénico dentro de la cavidad del sitio activo de estas enzimas puede llevarse a cabo por un puente de hidrógeno intramolecular, por una accesibilidad al solvente limitada, por la asociación con elementos apolares de la estructura de la proteína, o por la transferencia de carga del sulfenato con el anillo del FAD deficiente en electrones. El ácido sulfénico posteriormente reacciona con el GSH para regenerar la enzima activa (Fig. 5 C). Existen otras peroxirredoxinas que poseen dos residuos de cisteína en su sitio activo, por los que se las conoce como peroxirredoxinas de dos cisteínas. En estas enzimas, el tiolato de una de las cisteínas forma el sulfénico al reaccionar con el peróxido y, posteriormente, un disulfuro con el otro tiol. La enzima recupera su estado reducido al reaccionar con la tiorredoxina o el GSH. Otras enzimas, como la NADH peroxidasa y la NADH oxidasa, tienen mecanismos de catálisis similares, con formación de un intermediario sulfénico estable en su sitio activo (19).

Las proteínas tirosín fosfatasas catalizan la hidrólisis de fosfotirosina liberando fosfato y el residuo de tirosina. Su mecanismo de acción involucra la formación de un intermediario transitorio fosfoenzima, re-

sultado del ataque nucleofílico del tiolato del sitio activo sobre el grupo fosfato del sustrato, la fosfotirosina de la proteína blanco.

En el caso de las poliquétido sintasas el ataque nucleofílico del tiolato del residuo de cisteína catalítico es sobre la coenzima A, formando un intermediario acil-enzima.

En cuanto a las tiol:disulfuro oxidoreductasas, su mecanismo de reacción consiste en un ataque nucleofílico del tiolato de una de las dos residuos de cisteína que forman parte de su sitio activo sobre el disulfuro que se va a reducir. Como resultado de este ataque nucleofílico, se forma un disulfuro mixto con un residuo de cisteína del sustrato. Posteriormente, el otro residuo de cisteína del sitio activo ataca este disulfuro mixto liberando el tiol del sustrato y formando el disulfuro en el sitio activo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El estudio del papel de los residuos de cisteína presentes en muchas proteínas ha cobrado gran importancia debido a que, como se ha descrito anteriormente, éstos participan en muchos aspectos de la estructura y función de las proteínas. En forma paralela, la modificación de las cisteínas con fines biotecnológicos o farmacológicos está siendo abordada por numerosos laboratorios.

La facilidad con que los residuos de cisteína pueden formar puentes disulfuro inter o intramoleculares en ambientes oxidantes como es el aire, y el papel que juegan al formar puentes disulfuro en el mantenimiento de la estructura nativa de muchas proteínas, ya sea estabilizándolas o inactivándolas, ha propi-

ciado el que proteínas con aplicaciones biotecnológicas, -particularmente en biocatálisis-, sean manipuladas por mutagénesis sitio-dirigida. En este tipo de estudios se introducen residuos de cisteína que formen puentes disulfuros donde no los había, y de esta manera se busca incrementar la estabilidad de la proteína, o bien se reemplazan residuos de cisteína no esenciales, evitando así inactivación por formación de puentes disulfuro no deseados.

Como ejemplos de los estudios en los que los residuos de cisteína han sido considerados como un blanco atractivo para compuestos con acción farmacológica, son aquellos realizados con las aldehído deshidrogenasas y la triosa fosfato isomerasa. En el primer caso, el compuesto usado es el disulfiram (bis(dietilditio-carbamoil) disulfuro), que inhibe la aldehído deshidrogenasa hepática (ALDH2) modificando covalentemente su residuo de cisteína catalítico. La inhibición de esta enzima produce una elevación de acetaldehído después de una ingestión de alcohol, lo que provoca náuseas, vómito, taquicardia e hipotensión, por lo que este fármaco se ha utilizado clínicamente desde hace 50 años como tratamiento del alcoholismo. En el segundo caso, recientemente se ha encontrado que la modificación química de un residuo de cisteína que se encuentra en la interfase de la triosa fosfato isomerasa de ciertos parásitos produce la inactivación de la enzima por pérdida de su estructura cuaternaria. Por esta razón, se está explorando la posibilidad de que esta enzima sea un blanco para el diseño de compuestos con acción farmacológica contra enfermedades parasitarias (20).

REFERENCIAS

1. Denu J y Tanner K (1998) Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37: 5633-5642.
2. Creighton T E (1992) Folding pathways determined using disulfide bonds. En: *Protein Folding* (ed T E Creighton), W H Freeman, New York, pp 301-351.
3. Chivers P T, Prehoda K E y Raines R T (1997) The CXXC motif: a rheostat in the active site. *Biochemistry* 36: 4061-4066.
4. Tu B P, Ho-Schleyer S C, Travers K J y Weissman J S (2000) Biochemical basis of oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum. *Science* 290: 1571-1574.
5. Katzen F y Beckwith J (2002) Disulfide bond formation in periplasm of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 348: 54-66.
6. Arnér E y Holmgren A (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* 267: 6102-6109.
7. Cleland W W (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH group. *Biochemistry* 3: 480-482.
8. Buchanan B B, Schürmann P, Decottignies P y Lozano R M (1994) Perspectives in biochemistry and biophysics. Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. *Arch Biochem Biophys* 314: 257-260.
9. Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* 264: 13963-13966.
10. Shenton D, Perrone G, Quinn A K, Dawes, I W y Grant C M (2002) Regulation of protein S-thiolation by glutaredoxin 5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277:16853-16859.
11. Mannick J B y Schonhoff C M (2002) Nitrosylation: the next phosphorylation? *Arch Biochem Biophys* 408: 1-16.
12. Schwabe J W R y Klung A (1994) Zinc mining for protein domains. *Nature Struct Biol* 1: 345-349.
13. Gerber J y Lill R (2002) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components, mechanism and pathology. *Mitochondrion* 2: 71-86.
14. Narula S S, Brouwer M, Hua Y y Armitage I M (1995) Three-dimensional solution structure of *Callinectes sapidus* metallothionein-I determined by homonuclear and heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 34: 620-631.
15. Farrés J, Wang T, Cunningham 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.
16. Polgár L (1973) On the mode of activation of the catalytically essential sulfhydryl group of papain. *Eur J Biochem* 33: 104-109.
17. González-Segura L, Velasco-García R. y Muñoz-Clares R A (2002) Modulation of the reactivity of the essential cysteine residue of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* 361: 577-585.
18. 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.
19. Yeh J I, Claiborne A, y Hol W G (1996) Structure of the native cysteine-sulfenic acid redox center of enterococcal NADH peroxidase refined at 2.8 Å resolution. *Biochemistry* 35: 9951-9957.
20. Téllez-Valencia A, Ávila-Ríos S, Pérez-Monfort R, Rodríguez-Romero A, de Gómez-Puyou M T, López-Calahorra F y Gómez-Puyou A (2002) Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Comm* 295: 958-963.