

00528
46



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

EFFECTO DEL DISULFIRAM SOBRE LA ACTIVIDAD Y
ESTABILIDAD DE LA ENZIMA BETAÍNA ALDEHÍDO
DESHIDROGENASA DE HOJA DE *Amaranthus*
hypochondriacus L.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

DEISY HERVERT HERNÁNDEZ.



EXÁMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA



MÉXICO, D.F.

2003.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Jorge Manuel Vázquez Ramos.
Vocal	Profa. Rosario Adelaida Muñoz Clares.
Secretario	Profa. Herminia de Jesús Loza Tavera.
1er. Suplente	Profa. Mireya Rodríguez Penagos.
2º. Suplente	Profa. Ma. Manuela Nájera Martínez.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Facultad de Química, Conjunto E, Departamento de Bioquímica,
Laboratorio 102.**

ASESOR

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares.

Rosario Adelaida Muñoz Clares

SUPERVISOR TÉCNICO

Biol. Carlos Mújica Jiménez.

Carlos Mújica Jiménez

SUSTENTANTE

Deisy Hervert Hernández.

Deisy Hervert Hernández

A ti *Mamá*

A ti *Papá*

A *Maribel y Rocío*

Por ser las personas más importantes en mi vida y los seres que más amo.

Estoy muy orgullosa de la familia que SOMOS.

Sin su cariño no lo hubiera logrado. Con Amor...

Deisy

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a la **Dra. Rosario A. Muñoz Clares** por haberme recibido en su laboratorio y permitirme realizar este trabajo, por sus enseñanzas y por el apoyo que siempre me brindó.

Al jurado revisor de la presente tesis, integrado por el Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos, la Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera y la Dra. Rosario A. Muñoz Clares.

A la Coordinación de Superación Académica de la Facultad de Química que me acreditó como miembro del SUBPROGRAMA 127.

Con mucho cariño, al Biol. Carlos Mújica Jiménez, por estar siempre dispuesto a enseñarme sin reserva alguna, sin lo cual no hubiera podido realizar mi tesis. Además, por la amistad que pudimos entablar.

A todos mis compañeros de laboratorio, especialmente a Lilia y Fátima, que compartieron conmigo su valioso tiempo e hicieron cada día más placentero.

Brevemente, a mis amigos QA's, que se han convertido en lo mejor que me pudo pasar en estos años. A Ernesto, Goyo, Miguel y José Luis, porque son como los hermanos que no tuve. A Minerva y Lucila, que siempre han estado ahí en las buenas y en las malas.

A Adriana, Bere, Carmen, Gaby, Manzana, Pili, Chío y Violeta, por tantas y tantas cosas compartidas... y lo que nos falta!

A *tú*, que sabes mejor que nadie lo que me costó llegar hasta aquí y, que a pesar de todo, con tu comprensión e incondicional apoyo, hiciste que las cosas siempre fueran fáciles... Nunca olvidaré todo lo que hiciste por mí. Aunque el tiempo pase, siempre serás importante en mi vida. Gracias por todo Isaac.

A Erika, Evelyn, Alfonso, Melina, Alejandro y Marco Antonio, porque siempre están presentes en mi pensamiento.

Jorgito...por los viejos tiempos!

A todos aquellos amigos con quienes he compartido un fragmento de vida y que de algún modo han contribuido a mi formación tanto académica como humana.

TRABAJO APOYADO POR CONACYT, PROYECTO 37820.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	5
II.1. AMARANTO.....	5
<i>II.1.1 Características generales del cultivo.....</i>	<i>5</i>
<i>II.1.2 Fisiología del amaranto.....</i>	<i>6</i>
<i>II.1.3 Distribución nacional.....</i>	<i>7</i>
<i>II.1.4 Importancia nutrimental y tecnológica.....</i>	<i>8</i>
II.2. RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A ESTRÉS AMBIENTAL.....	12
<i>II.2.1 Osmolitos compatibles.....</i>	<i>12</i>
<i>II.2.2 Glicina betaína.....</i>	<i>15</i>
II.3. LAS ENZIMAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS.....	21
II.4. BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA.....	26
<i>II.4.1 Propiedades moleculares.....</i>	<i>27</i>
<i>II.4.2 Mecanismo cinético y de reacción.....</i>	<i>28</i>
II.5. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE PROTEÍNAS.....	32
<i>II.5.1 Técnica de modificación química.....</i>	<i>33</i>
<i>II.5.2 La reactividad química de los residuos de cisteína.....</i>	<i>34</i>
<i>II.5.3 Reactivos específicos de grupos tiol.....</i>	<i>36</i>
II.6. DISULFIRAM.....	38
<i>II.6.1 Generalidades.....</i>	<i>38</i>
<i>II.6.2 Mecanismo de inhibición de las ALDHs por disulfiram.....</i>	<i>39</i>
<i>II.6.3 Análogos del disulfiram inhibidores de las ALDHs.....</i>	<i>41</i>
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	43
IV. HIPÓTESIS.....	44
V. OBJETIVOS.....	45
V.1. OBJETIVO GENERAL.....	45
V.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	45
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
VI.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	46
VI.2. EQUIPO Y REACTIVOS.....	46
VI.3. METODOLOGÍA.....	47
<i>VI.3.1 Extracción y purificación de la BADH.....</i>	<i>47</i>
<i>VI.3.2 Determinación de proteína.....</i>	<i>49</i>
<i>VI.3.3 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida.....</i>	<i>50</i>
<i>VI.3.4 Determinación de actividad enzimática.....</i>	<i>52</i>
<i>VI.3.5 Estudios cinéticos de inactivación de la BADH por DSF.....</i>	<i>54</i>
<i>VI.3.6 Estudios de reactivación de la BADH modificada por DSF.....</i>	<i>55</i>

VI.3.7 Análisis de datos.....	55
VI.3.8 Caracterización estructural de la BADH modificada por DSF.....	56
VI.3.8.1 Cromatografía de exclusión molecular.....	56
VI.3.8.2 Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida.....	57
VI.3.8.3 SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras.....	59
VI.3.8.4 Fluorescencia intrínseca.....	59
VII. RESULTADOS.....	60
VII.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA BADH.....	60
VII.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE LA BADH POR DSF.....	61
VII.2.1 Efecto del DSF sobre la BADH en condiciones aerobias y en presencia de un reductor.....	61
VII.2.2 Efecto del DSF sobre la BADH en condiciones anaerobias y en ausencia de un reductor.....	62
VII.3. CINÉTICA DEL PROCESO DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA BADH POR DSF.....	64
VII.3.1 Dependencia del tiempo de incubación y la concentración de DSF.....	64
VII.3.2 Efecto del pH sobre la cinética de inactivación por DSF.....	68
VII.4. EFECTO DE LOS LIGANDOS EN LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA BADH POR DSF.....	69
VII.5. REACTIVACIÓN DE LA BADH INACTIVADA POR DSF POR AGENTES REDUCTORES.....	72
VII.6. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA BADH MODIFICADA.....	75
VII.6.1 Efecto del DSF en el estado de agregación de la enzima.....	76
VIII. DISCUSIÓN.....	85
VIII.1. INACTIVACIÓN DE LA BADH POR DSF.....	85
VIII.2. EFECTO DE LOS LIGANDOS EN LA INACTIVACIÓN DE LA BADH POR DSF.....	90
VIII.3. CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA BADH MODIFICADA POR DSF Y POSIBLE MECANISMO DE INACTIVACIÓN.....	91
IX. CONCLUSIONES.....	97
X. PERSPECTIVAS.....	98
XI. REFERENCIAS.....	99
APÉNDICE.....	107

Artículo: "Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram" (2003) Chem.-Biol. Interact. 143-144, 149-158.

RESUMEN

La betaina aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) cataliza la oxidación irreversible, dependiente de NAD^+ , de la betaina aldehído para producir glicina betaina, un eficiente osmoprotector. El disulfiram (DSF) es un inhibidor de las aldehído deshidrogenasas, ampliamente usado en el tratamiento de alcoholismo, que actúa oxidando a la cisteína esencial que reside en el sitio activo. Como parte de un estudio comparativo de las propiedades funcionales y estructurales de BADHs de origen bacteriano, vegetal y animal, en este trabajo estudiamos el efecto del disulfiram sobre la enzima de hoja de amaranto. Se encontró que el DSF la inactiva en una manera dependiente del tiempo y de la dosis. Este proceso sigue una cinética bifásica, con constantes de velocidad de inactivación de segundo orden de 11.67 ± 0.05 y $0.50 \pm 0.04 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para las fases de inactivación rápida y lenta, respectivamente. Sorprendentemente, betaina aldehído, NAD^+ y NADH , no sólo no protegen a la enzima, sino que promueven un incremento en la velocidad de inactivación. Este resultado sugiere que los ligandos inducen un cambio conformacional que aumenta la reactividad y/o accesibilidad de la cisteína catalítica. La enzima inactivada por DSF en presencia del sustrato se reactiva por ditioneitol, pero no por el reductor fisiológico glutatión. El inhibidor no produce cambios en el estado de oligomerización de la proteína, pero provoca la formación de un puente disulfuro intrasubunidad.

ABREVIATURAS

ALDH	Aldehído deshidrogenasa
ATP	Trifosfato de adenosina
BA	Betaina aldehído
BADH	Betaina aldehído deshidrogenasa.
β-SHOH	β -mercaptoetanol
C₃	Plantas que fijan el CO ₂ exclusivamente por el ciclo de Calvin
C₄	Plantas que poseen el ciclo de ácidos dicarboxílicos además del de Calvin
CAM	Plantas que poseen el metabolismo ácido de las crasuláceas
cDNA	DNA complementario al RNA mensajero
CMO	Colina monooxigenasa
Cys	Residuo de cisteína
DDC	<i>N,N</i> -dietilditiocarbamato
DMSF	Dimetilsulfoniopropionato
DSF	Disulfiram
DTT	Ditiotreitol
E	Enzima
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético
EPTC	<i>S</i> -etil <i>N,N</i> -dipropiltiocarbamato
<i>g</i>	Valor de gravedad
GAPD	3-fosfatogliceraldehído
GB	Glicina betaina
GSH	Glutación reducido
<i>k</i>	Constante de velocidad
MeDDC	<i>N</i> -metil <i>N,N</i> -dietilditiocarbamato
MeDTC	<i>S</i> -metil <i>N,N</i> -dietiltiocarbamato
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina (forma reducido)
NADP⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina fosfato (forma oxidada)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PEG	Polietilenglicol.
PER	Razón de la eficiencia de proteína
SSALD	Succinilsemialdehído
SDS	Dodecil sulfato de sodio
-SH	Sulfhidrilo
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametiletildiamina
Trp	Residuo de triptófano

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más graves que enfrenta la agricultura actualmente es la gran cantidad de suelos que en forma regular o esporádica están sometidos a periodos de sequia, o que no pueden cultivarse debido a la acumulación de sales, a consecuencia de prácticas agrícolas inadecuadas como abuso de fertilizantes y alta irrigación. Estas condiciones ambientales producen en las plantas un fenómeno conocido como estrés osmótico, que conlleva pérdida de agua por las células y afecta severamente la productividad. El amaranto es una dicotiledónea, muy tolerante a sequia, de gran interés agrícola por el alto contenido proteinico de sus semillas, que son usadas ampliamente como alimento en la dieta mexicana. Esta planta constituye, por tanto, un modelo interesante para el estudio de las bases moleculares de la respuesta de las plantas a estrés osmótico, que puede además tener importantes aplicaciones biotecnológicas en un futuro.

En una gran variedad de organismos, desde bacterias hasta animales, la respuesta metabólica más general al estrés osmótico es la síntesis y acumulación en el citoplasma de compuestos orgánicos neutros conocidos como solutos compatibles u osmoprotectores, los cuales evitan gran parte de los daños ocasionados por la deshidratación celular al igualar el potencial osmótico del citoplasma con el del medio externo y al estabilizar estructuras proteicas y membranales.

La enzima betaina aldehído deshidrogenasa (BADH, EC 1.2.1.8) cataliza la oxidación irreversible, dependiente de NAD^+ , de betaina aldehído para producir glicina betaina. Este último compuesto es uno de los osmoprotectores conocidos más eficientes que se produce en respuesta al estrés osmótico tanto en bacterias como en algas, plantas o animales. En el caso de las plantas, la glicina betaina es un blanco potencial de ingeniería metabólica, ya

que muchas plantas de interés agrícola no poseen la capacidad de sintetizar y acumular este potente osmolito. De hecho, se están haciendo intentos de transformar plantas con las enzimas involucradas en su síntesis, pero uno de los problemas más importantes con este tipo de enfoques experimentales es que existe un gran desconocimiento acerca de la estructura de la enzima y los mecanismos que regulan su actividad.

El Disulfiram (DSF) es una sustancia que desde hace 50 años se utiliza clínicamente en el tratamiento de enfermos del alcoholismo. Se sabe que éste ejerce su efecto farmacológico a través de una inhibición de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) mitocondrial de hígado de mamíferos. Se ha demostrado, en estudios *in vitro*, que el DSF inhibe directamente a la ALDH de mitocondria de hígado de rata (ALDH clase 2) al formar un enlace disulfuro intramolecular entre dos de las tres cisteínas contiguas presentes en el sitio activo de la enzima. En relación al efecto que tiene este compuesto sobre las BADHs (también aldehído deshidrogenasas), se ha encontrado que la enzima de hígado humano es, *in vitro*, insensible al DSF; sin embargo, no se han realizado estudios acerca del efecto que este compuesto tiene sobre otras BADHs, concretamente la de plantas. Como parte de un estudio comparativo de las propiedades funcionales y estructurales de BADHs de diferentes orígenes, bacteriano, vegetal y animal, el presente trabajo se encaminó a profundizar en este aspecto. Para ello, fue necesario realizar estudios de modificación química de la enzima y caracterizar en términos cinéticos y estructurales este cambio. Además, se evaluó la influencia de los sustratos y productos de la enzima sobre el proceso de modificación covalente por DSF. En conjunto, y con base en los resultados obtenidos, fue posible establecer una propuesta de mecanismo de inactivación que se ajusta satisfactoriamente a los hallazgos experimentales.

II. ANTECEDENTES

II.1 AMARANTO

El amaranto fue un cultivo fundamental entre las civilizaciones prehispánicas del Nuevo Mundo. Su presencia data de cerca del año 4000 a.C., en la región del valle de Tehuacán, México. En el México prehispánico el amaranto constituyó uno de los cultivos básicos en la alimentación junto con el maíz, frijol, calabaza y chiles de diferentes especies.

II.1.1 Características generales del cultivo

El amaranto es una dicotiledónea del orden *Caryophyllales* perteneciente a la familia *Amaranthaceae* que comprende hierbas anuales o perennes, con hojas opuestas o alternas y sin estipulas. La taxonomía del amaranto es la siguiente: Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; eudicotyledoneae; Caryophyllidae; Caryophyllales; Amaranthaceae; Amaranthus. Los miembros del género *Amaranthus* se encuentran ampliamente distribuidos en las regiones tropicales, subtropicales y aun templadas del mundo entero. El género comprende unas 60 especies. Los colores del tallo y las hojas van de rojo a verde con una multitud de matices intermedios, y de ramificado a no ramificado; los colores de la semilla varían desde el negro al blanco.

Después de varios estudios se ha llegado a la conclusión que las especies de semilla comestible se reducen a: *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus caudatus* y *Amaranthus cruentus* (Trinidad-Santos *et al.*, 1990). De las tres especies anteriores, sólo *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* se cultivan en México y *A. caudatus* en Sudamérica (Trinidad-Santos y Gómez-Lorence, 1986).

II.1.2 Fisiología del amaranto

El amaranto es una planta eficiente en su proceso fotosintético, ya que tiene metabolismo C4, mecanismo de fijación de carbono que supera en eficiencia al resto de las plantas CAM y C3. Las plantas con ruta C4 crecen, en general, más rápidamente y responden mejor bajo condiciones ambientales adversas. Tienen un uso más eficiente del agua consumida para formar biomasa, en comparación con las plantas C3 (Flores Zenil, 1994). El amaranto es una planta mesofítica, no resistente a la sequía pero que muestra un uso de agua muy eficiente (300 g de agua transpirada/ g de materia seca), mientras que otros vegetales como el trigo y la cebada, que son plantas con metabolismo C3, tienen un mayor consumo de agua por gramo de materia seca (540 y 5420 g de agua transpirada/ g de materia seca, respectivamente) (Del Río-Portilla, 1988). Es notable que incluso requiere menos agua que el maíz, una planta con metabolismo C4 de gran interés agronómico y cultural (Flores-Zenil, 1994; Trinidad-Santos y Gómez-Lorence, 1986).

Además, pese a que el amaranto no es resistente a la sequía, una de sus características que llama la atención es la rápida toma de agua para restablecer la turgencia de sus hojas, la que se lleva a cabo en aproximadamente 20 minutos. Por estas características se considera que es una planta **tolerante** a la sequía.

Por otra parte, se ha encontrado que en las hojas de amaranto, después de ser sometidas a 6 horas de déficit hídrico con una solución de polietilenglicol (PEG), lo que conlleva a una reducción en su cantidad relativa de agua de un 90 a un 70%, se produce un incremento en los niveles de amonio y glicina betaína y en la actividad de las enzimas glutamato sintetasa y betaina aldehído deshidrogenasa (Gamboa *et al.*, 1991; Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Se ha sugerido que la estimulación de la fotorrespiración en las etapas tempranas del

estrés produce el incremento de amonio que será usado para la subsecuente síntesis de glicina betaina

El cultivo de amaranto se desarrolla mejor cuando la temperatura es alta, alcanzando cuando menos los 21°C, con un óptimo de temperatura para la germinación entre los 16 y 35° C, y su rapidez de maduración se incrementa cuando las temperaturas alcanzan el límite superior de este intervalo. Las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* toleran temperaturas altas y no resisten temperaturas bajas ni heladas; su crecimiento cesa a los 8 °C y las plantas se dañan a temperaturas inferiores a las -4°C (Flores Zenil, 1994). En los últimos años, la superficie de siembra en México se ha incrementado por su capacidad de adaptabilidad a la mayoría de las condiciones climáticas del país y, sobre todo, por ser tolerante a la sequía.

El amaranto por ser un cultivo de ciclo corto, tolerante a la sequía, con un alto valor nutritivo de semilla y hojas (17% proteínas, carbohidratos asimilables, vitaminas y minerales), y con múltiples usos y formas de aprovechamiento se considera como un cultivo alternativo para muchos lugares donde hay escasez e irregularidad de lluvias y donde, incluso, se presentan problemas de abasto de alimentos que afectan la salud poblacional (Flores Zenil, 1994).

11.1.3 Distribución nacional

Como ya se mencionó, el amaranto es uno de los cultivos más antiguos de América. En México, la producción comercial de amaranto actualmente se concentra en cuatro regiones productoras, de acuerdo con Trinidad-Santos (1990), todas ellas de temporal.

1. San Miguel del Milagro, Nativitas, San José Atoyotenco, y San Felipe Ixtacuixtla en el estado de Tlaxcala.

2. Huazulco, Amilcingo, Jantetelco y Ameyulca en el Estado de Morelos.
3. Tulyehualco, Nativitas, Milpa Alta y Xochimilco en el Distrito Federal.
4. Huaquechula, Santiago Tecla y Tulcingo del Valle en el Estado de Puebla.

Recientemente, se ha despertado gran interés por su cultivo en varias partes del mundo debido al alto valor nutritivo de la semilla del amaranto

II.1.4 Importancia nutrimental y tecnológica

Una de las características más importantes del amaranto es, sin duda, su alto valor nutritivo (Tabla 2). Las plantas de amaranto, además, se pueden aprovechar de múltiples formas: como grano, como verdura o como forraje. La semilla presenta una gran versatilidad, pudiéndose utilizar en la preparación de diversos alimentos y tiene, además, un prometedor potencial de utilidad industrial, tanto en la industria de los alimentos como en la elaboración de cosméticos y colorantes.

Técnicamente el grano de amaranto es considerado como un pseudocereal, ya que tiene características similares a las de los granos de cereales verdaderos de las monocotiledóneas. Al igual que éstos, contiene cantidades importantes de almidón, con la diferencia de que éste se encuentra almacenado en el perispermo y el embrión ocupa gran parte del grano, conformando así una buena fuente de lípidos y también de proteínas. Sin embargo, por ser una dicotiledónea, no es considerado como un cereal verdadero. Es importante señalar que estas características de su estructura son importantes en la determinación de las tecnologías a utilizar en el procesamiento del grano.

Diversos autores han reportado contenidos de proteína en amaranto que van de 15 a 17% (p/p), pero su importancia no radica sólo en la cantidad sino en la calidad de la proteína, ya

que presenta un excelente balance de aminoácidos. Por su composición, la proteína del amaranto se asemeja a la proteína ideal propuesta por la FAO para la alimentación humana. Tiene un contenido importante de lisina, aminoácido esencial en la alimentación humana y que comúnmente es limitante en otros cereales (Tabla 1).

TABLA 1. Perfil de aminoácidos esenciales de los granos y semillas de mayor consumo en Latinoamérica, datos expresados por cada 100 g de alimento (Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, 1997).

AMINOÁCIDOS ESENCIALES	AMARANTO SEMILLA	ARROZ PULIDO	MAÍZ GRANO	FRIJOL PROMEDIO	TRIGO GRANO
Isoleucina (mg)	695.00	296.00	350.00	927.00	426.00
Leucina (mg)	1030.00	581.00	1190.00	1685.00	871.00
Lisina (mg)	970.00	255.00	254.00	1593.00	374.00
Metionina (mg)	344.00	150.00	182.00	234.00	196.00
Fenilalanina (mg)	707.00	342.00	464.00	1154.00	589.00
Treonina (mg)	676.00	234.00	342.00	878.00	382.00
Triptofano (mg)	51.00	95.00	67.00	223.00	142.00
Valina (mg)	842.00	408.00	461.00	1016.00	577.00
Arginina (mg)	1449.00	454.00	398.00	1257.00	602.00
Histidina (mg)	451.00	165.00	258.00	627.00	299.00

Por ello, se han desarrollado técnicas para extraer de la semilla de amaranto concentrados proteínicos de alto valor que pueden ser usados en la elaboración de diversos alimentos para elevar su valor nutritivo. Estos concentrados pueden sustituir a la proteína de la soya que se utiliza en la elaboración de muchos productos que hoy día ya son populares, con la ventaja de un menor costo. Un uso novedoso que se ha dado a estos extractos es en la elaboración de mayonesas y aderezos bajos en calorías. Aprovechando las características aglutinantes del grano, se sustituye la grasa que comúnmente contienen dichos aderezos por

el extracto proteínico de amaranto, que da la consistencia al producto. Otro producto que se encuentra en desarrollo es una bebida de amaranto denominada "leche de amaranto". Esta bebida representa una opción viable y más económica para personas que presentan intolerancia a la lactosa. Promover su consumo, sobre todo entre la población infantil ayudaría a elevar el nivel nutricional de la población, particularmente la de escasos recursos.

El almidón es el componente principal en la semilla del amaranto, pues representa entre 50 y 60% de su peso seco. El almidón del amaranto posee dos características distintivas que lo hacen muy prometedor en la industria: tiene propiedades aglutinantes inusuales y el tamaño de la molécula es muy pequeño (aproximadamente un décimo del tamaño del almidón del maíz). Estas características se pueden aprovechar para espesar o pulverizar ciertos alimentos o para imitar la consistencia de la grasa.

Por lo general el grano es utilizado en la elaboración de dulces, llamados "alegrías". No obstante, se han hecho también estudios sobre su potencialidad de utilización como un complemento en la composición nutritiva de harinas. La harina de amaranto se utiliza para la elaboración de atoles, tamales, tortillas, galletas, pastas para sopa, polvo para bebidas instantáneas, cereales u hojuelas, pasteles, botanas, confites, pinoles, mermeladas y budines, y se puede mezclar con la harina de otros cereales como la del maíz para suplementación de los productos (Trinidad-Santos y Gómez-Lorence, 1986).

En el impulso a la industrialización del amaranto no sólo se ha puesto atención al grano, ya que también las hojas pueden ser aprovechadas como verduras y, cuando la planta está madura, como alimento para ganado. El valor nutritivo de las hojas de amaranto ha sido también ampliamente estudiado y se ha encontrado que la hoja contiene alto contenido de calcio, hierro, fósforo y magnesio, así como de ácido ascórbico, vitamina A y fibra. El

cultivo de amaranto para aprovechar únicamente las hojas requiere mayor humedad, ya que se ha observado que bajo condiciones de déficit hídrico las hojas contienen altos niveles de oxalatos y nitratos, que pueden tener efectos adversos para la nutrición humana o animal. No obstante, al hervir las hojas la concentración de estos compuestos disminuye. Otro proyecto importante es el desarrollo de una bebida de fibra dietética y laxante a partir de las hojas de amaranto.

TABLA 2. Comparación del valor nutritivo de la semilla de Amaranto y otros granos y semillas de uso común, datos expresados por cada 100 g de alimento (Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán, 1997).

CARACTERÍSTICA	AMARANTO SEMILLA	ARROZ PULIDO	MAÍZ AMARILLO	FRIJOL PROMEDIO
Porción comestible % (p/p)	100.00	100.00	92.00	100.00
Humedad % (p/p)	12.30	11.20	13.80	7.90
Fibra cruda(g)	6.70	1.90	12.20	4.30
Energía (kcal)	358.00	364.00	350.00	332.00
Hidratos de carbono (g)	65.10	78.00	69.60	61.50
Proteínas totales (g)	12.90	7.40	8.30	19.20
Grasas totales (g)	7.20	1.00	4.80	1.80
Calcio (mg)	247.00	10.00	158.00	228.00
Fósforo (mg)	500.00	104.00	235.00	407.00
Hierro (mg)	3.40	1.10	2.30	5.50
Riboflavina (mg)	0.32	0.03	0.08	0.14
Niacina (mg)	1.00	1.60	1.60	1.70

En resumen, el amaranto tiene varias formas de utilización y su consumo va desde la planta verde hasta la semilla tostada. Debido a ello y a su amplia versatilidad se ha convertido en un cultivo potencial en zonas con escasa precipitación. Su utilización gira en torno a su

importancia alimentaria y a la gran cantidad de productos derivados que se han desarrollado a base de amaranto.

11.2 RESISTENCIA DE LAS PLANTAS A ESTRÉS AMBIENTAL.

El estrés ambiental causa pérdidas significativas de cosechas. Existen numerosos tipos de estrés que con frecuencia son específicos para una cosecha o ubicación determinada. Dentro de los tipos de estrés ambiental más frecuentes se encuentran: sequía, alta salinidad, temperaturas extremas, hipoxia (abastecimiento restringido de oxígeno en suelo compactado), deficiencia de nutrientes minerales, toxicidad por metales, contaminantes, y radiación incrementada UV. La investigación en esta área se lleva a cabo con la esperanza de mejorar el rendimiento de las cosechas afectadas.

11.2.1 Osmolitos compatibles

El estrés hídrico es quizás la causa más común que ocasiona pérdidas en el rendimiento de las cosechas y, a la vez, representa el aspecto más difícil de abordar debido a la fuerte relación que existe entre la transpiración y la fotosíntesis.

Las numerosas respuestas al déficit hídrico son controladas por un conjunto de genes con funciones diferentes. Conforme se pierde el agua de la célula vegetal, se inician una serie de procesos reguladores que ajustan el metabolismo a las nuevas condiciones. Algunos de los genes inducidos por el déficit hídrico codifican productos que probablemente protegen el funcionamiento de la célula. Los genes tipo *lea* codifican proteínas de embriogénesis tardía, cuyas funciones consisten en el secuestro de iones, la protección de otras proteínas o membranas y la renaturalización de las proteínas (Dure, 1993). Además se han identificado

otras proteínas como los inhibidores de proteasas, las proteínas de almacenamiento vegetativo, las ATPasas que regulan el potencial osmótico y compartimentalización de iones, los canales de agua y aquaporinas (Bonhert *et al.*, 1995) y muchas otras, como se muestra en la Figura 1.

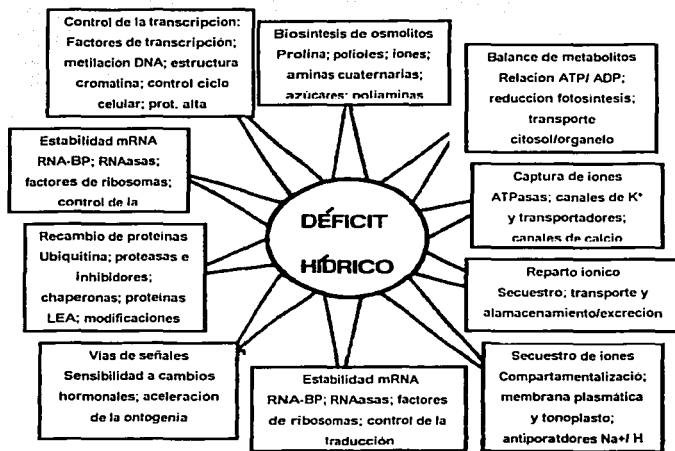


Figura 1. Respuestas de las plantas al déficit hídrico. Los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares ayudan a la planta a mantener el metabolismo y restauran las condiciones que permiten el crecimiento bajo estrés (Bonhert *et al.*, 1995).

La respuesta bioquímica mejor caracterizada de la célula vegetal ante el estrés osmótico, producido ya sea por déficit hídrico o bien, alta salinidad o bajas temperaturas, es la acumulación de solutos orgánicos u osmoprotectores, un fenómeno conocido más comúnmente como ajuste osmótico u osmoadaptación. La osmoadaptación involucra la acumulación intracelular (a través de la síntesis o captación desde el medio) de dichos osmolitos orgánicos, los cuales no interfieren con el metabolismo. Este fenómeno produce una reducción del potencial hídrico de la célula por debajo del potencial hídrico externo debido a dicha acumulación de osmolitos en el citoplasma, lo que promueve el movimiento del agua al interior de la célula y, como resultado, se mantiene el potencial hídrico total.

Las plantas acumulan una variedad de solutos benignos metabólicamente que en conjunto se conocen como *solutos compatibles* u *osmolitos*. Su función primaria es el mantenimiento del turgor, pero también pueden tener otros efectos protectores sobre las macromoléculas en células deshidratadas. La acumulación de osmolitos no se restringe a las plantas, ya que organismos como las bacterias y los animales también utilizan esta respuesta adaptativa.

Los solutos compatibles son compuestos neutros excluidos de la superficie de las proteínas y de su esfera de hidratación inmediata, que tienden a estabilizar la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas (Wyn Jones *et al.*, 1977). Los solutos acumulados varían entre especies y en las plantas son compuestos neutros a pH fisiológico dentro de los que se incluyen aminoácidos como la prolina, sales cuaternarias de amonio como betainas, terciarios de amonio como dimetilsulfoniopropionato (DMSP), polioles como el glicerol, manitol, sorbitol, pinitol y azúcares como la sacarosa, trehalosa, rafinosa y fructanos. Una gran cantidad de estudios apoya la idea de que la acumulación de prolina, glicina betaina y

otras sales cuaternarias de amonio puede ser importante en la adaptación de las plantas a ambientes muy secos o salinos.

La síntesis de osmolitos compatibles no tóxicos para las células puede reducir al máximo el daño a proteínas y a otras moléculas causado por déficit de agua. Los solutos compatibles en plantas generalmente se presentan en cantidades altas en el citoplasma de las células (Hall *et al.*, 1978), ya que de no ser así no serían lo suficientemente efectivos para contrarrestar el estrés osmótico (Wyn, Jones *et al.*, 1977). Para esto se requiere que estos solutos compatibles sean los principales que se acumulen en el citoplasma y que los solutos tóxicos no compatibles (como los iones inorgánicos) sean secuestrados en vacuolas (Hall *et al.*, 1978).

En la última década, se han producido plantas transgénicas en las cuales ocurre la sobreacumulación de osmolitos (por ejemplo de prolina), o en las que la habilidad para acumular osmolitos no estaba presente antes de ser introducida. Los resultados sugieren que los osmolitos compatibles pueden mejorar el crecimiento de la planta durante estrés osmótico incluso a niveles osmóticamente insignificantes (Smirnov, 1995).

II.2.2 Glicina betaina

La glicina betaina (GB) debe su nombre al productor más conocido de este compuesto, la remolacha azucarera. En 1866 ya se había aislado GB a partir de este vegetal. La remolacha azucarera contiene 1-1.5% (peso seco celular) de GB, dependiendo de la fase de crecimiento (Nyssölä, 2001). Actualmente, GB se produce por separación cromatográfica a partir de molasas de remolacha azucarera (Heikkilä *et al.*, 1982 en Nyssölä, 2001).

Químicamente, la glicina betaina es un derivado *N,N,N* metilado de la glicina (Fig. 2). Posee las propiedades de un soluto compatible ideal. Su masa molecular es relativamente baja (117.15 g/mol) y es altamente soluble en agua (1.6 g/g H₂O). La glicina betaina es una sal cuaternaria de amonio, por lo que tiene una carga positiva pero a pH fisiológico su carga neta es cero porque su grupo carboxilo está desprotonado

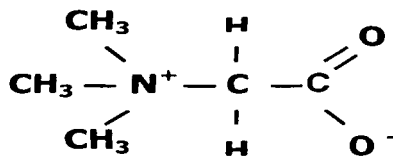


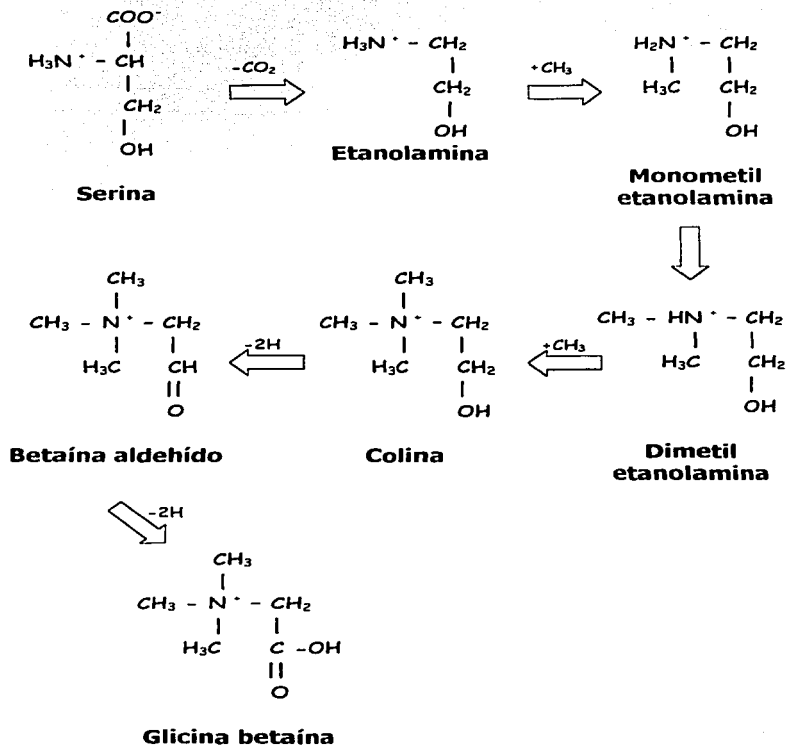
Figura 2. Estructura química de la glicina betaina (*N,N,N*-trimetil glicina).

La glicina betaina es sintetizada por una amplia variedad de especies. Entre ellas se encuentran plantas superiores, bacterias, algas y animales marinos. De las familias dicotiledóneas en que se ha reportado acumulación de glicina betaina se encuentran: *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae* y *Portulacaceae* (*Carophyllales*); *Malvaceae* (Malvales); *Convolvulaceae* y *Cuscutaceae* (Polemoniales); *Compositae*; *Plumbaginaceae*; *Gramineae*; *Leguminaceae* (Weretilnyk y Hanson, 1989).

La ruta de biosíntesis de glicina betaina a partir de serina que se ha demostrado en espinaca es la que se muestra en la Figura 3 (Coughlan y Wyn Jones, 1982). GB se sintetiza a partir de colina via betaina aldehído en dos reacciones consecutivas catalizadas por las enzimas colina monooxigenasa (CMO) y betaina aldehído deshidrogenasa (BADH).



Figura 3. Síntesis de glicina betaína sin la participación de grupos fosforilados. Esta vía se demostró en espinaca (Coughlan y Wyn Jones, 1982).



Algunas bacterias convierten colina a glicina betaina en una reacción de un sólo paso catalizada por una enzima bifuncional, la colina oxidasa. El gen *CoI A*, que codifica la colina oxidasa de *Arthrobacter globiformis*, ha sido expresado en *Arabidopsis*, especie que de forma natural no acumula betaina aldehído. El gen contenía además una secuencia señal para cloroplasto. La concentración promedio de GB en la hoja de las plantas transformadas fue baja, pero si se analizaba exclusivamente el cloroplasto, era de 50 mM, la cual se acerca a una concentración osmóticamente significativa. Las plantas transgénicas, analizadas mediante fotografías y la medición de su longitud, fueron más tolerantes a NaCl y a luz continua a 5° C (Hayashi *et al.*, 1997). Existen reportes de que la expresión de la BADH de *Atriplex hortensis* en arroz incrementa el contenido de GB y la tolerancia a la salinidad. También se ha documentado que la aplicación de GB mediante aerosoles foliares mejora el crecimiento de tabaco en condiciones de déficit hídrico, tanto en experimentos de laboratorio, como en cultivos de maíz, sorgo y soya en el campo con baja actividad de agua. Cabe destacar que además del incremento en la biomasa, se obtuvo un mayor rendimiento en granos. Estas interesantes observaciones requieren más investigación, quizás, para descartar la posibilidad de que el incremento en el crecimiento fuese causado por un abastecimiento mejorado de nitrógeno. Contrario a esto, GB exógeno es aparentemente tóxico para *Brassica napus*, una planta que no acumula este compuesto (Gibon *et al.*, 1997).

La enzima BADH de hoja de amaranto (EC 1.2.18) es igualmente eficiente en la catálisis de la oxidación del 3-dimetilsulfoniopropionaldehído a DMSP, un soluto compatible de menor distribución que GB (Vojtechová *et al.*, 1997). La BADH de remolacha expresada en tabaco transgénico también ha presentado actividad deshidrogenasa hacia el 3-

dimetilsulfoniopropionaldehído y otros dos aldehídos, lo que nos proporciona una perspectiva de que la BADH de ciertas plantas es una enzima multisustrato (Trossat *et al.*, 1997).

La expresión de la BADH puede estar más ampliamente distribuida que la acumulación de GB. La BADH se expresa en arroz (no acumula GB) y el gen de arroz tiene una alta homología con el gen de cebada, una especie que sí acumula GB. A diferencia de la BADH de las plantas que acumulan GB, la cual se localiza en cloroplasto, la enzima de arroz se localiza en los peroxisomas. Al abastecer con BADH a las plantas de arroz se incrementa su contenido de GB, y con base en evidencia fotográfica, se mejora el crecimiento de las plantas bajo alta salinidad (Nakamura *et al.*, 1997).

Además de su interés agronómico, la GB y sus sales tienen usos comerciales en productos dentales, farmacéuticos y cosméticos, y especialmente como un ingrediente del forraje. En células animales, GB actúa como un osmoprotector y como un grupo donador de metilos. Por ello, es útil en la metilación de la homocisteína para dar lugar a la metionina en una reacción en la cual se forma dimetilglicina. La metionina sintetizada puede entonces usarse como un grupo donador de metilos en todos los organismos. Uno de los grupos metilo de la dimetilglicina se emplea en la metilación posterior del metiltetrahidrofolato, el cual puede entonces también usarse en la síntesis de metionina a partir de homocisteína. Debido a estas reacciones, la GB provee una manera eficiente de abastecer grupos metilo en la dieta (Nyyssölä, 2001).

Durante la fermentación, las altas concentraciones de sustratos que se manejan en el medio pueden ocasionar estrés osmótico y se ha visto que GB puede aligerar el estrés osmótico de algunos microorganismos industrialmente importantes (Nyyssölä, 2001). El hecho de que GB funcione como un osmolito compatible le da la oportunidad de ser utilizado en la

industria de la fermentación. De hecho, GB se vende comercialmente para este fin (NutritismTM, Danisco Corp.) (Nyssöla, 2001).

Entre los osmolitos compatibles de importancia además de GB se encuentran la trehalosa y el manitol. La trehalosa es un efectivo protector contra la desecación en animales y microorganismos, pero es raro en plantas vasculares con la excepción de unas cuantas especies tolerantes a la desecación. Por su parte, el manitol es acumulado por una gran variedad de especies en respuesta a la sequía y a la salinidad. Se ha sugerido que los solutos compatibles, incluyendo el manitol, podrían ser antioxidantes al "atrapar" radicales hidroxilo (OH) (Smirnov, 1993; Orthen *et al.*, 1994). Esto puede ser significativo para las plantas expuestas a sequía y alta salinidad ya que existe una sólida evidencia de que la generación de especies reactivas de oxígeno se incrementa bajo tales condiciones (Smirnov, 1993; Biehler y Fock, 1996). Esto sugiere que los osmolitos podrían tener, de hecho, múltiples funciones y podría explicar los efectos protectores observados a concentraciones osmóticamente insignificantes. No obstante, GB no actúa como atrapador de radicales libres, papel que sí pueden jugar otros osmolitos como prolina (Smirnov, 1993).

Una gran parte de los osmolitos compatibles mencionados son sintetizados en plantas. La protección contra el estrés por parte de la GB se ha considerado como una evidencia que indica que la introducción de la síntesis de GB en plantas puede usarse para mejorar su tolerancia a la sequía y salinidad. Por ello, los efectos protectores de la GB en plantas han sido y son de particular interés. El uso de plantas transgénicas está proveyendo información nueva sobre los papeles fundamentales de antioxidantes y solutos compatibles en células sobrevivientes a condiciones extremas. Sin embargo, se requieren más estudios en esta área

de investigación, ya que una enzima tan importante a este respecto como la BADH, aún no se ha caracterizado lo suficiente.

11.3 LAS ENZIMAS ALDEHÍDO DESHIDROGENASAS

Las enzimas aldehído deshidrogenasas se encuentran distribuidas en toda la escala filogenética desde las bacterias hasta los mamíferos. La variedad de sustratos que aceptan las ALDH incluye no solo aldehídos alifáticos y aromáticos, sino también aldehídos 2-halogenados, 2-hidroxi y 2-enoico.

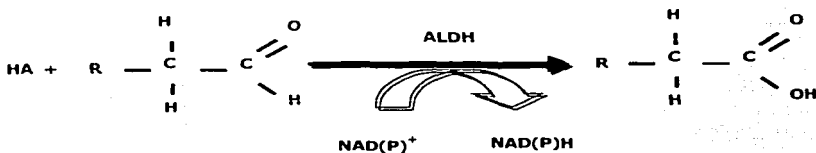


Figura 4. Reacción general de las aldehído deshidrogenasas

Las enzimas ALDH se clasifican en diferentes categorías de acuerdo a ciertos criterios. En las ALDHs clase I el agua participa como reactante en la reacción de catálisis. Cuando A (Fig. 4) representa un fosfato, arsenato o un mercaptano, la enzima se clasifica como de la clase II. La clase III se ha reservado para las enzimas que combinan algunas de las funciones antes mencionadas (Jakoby, 1963). Otro criterio de clasificación se refiere a su compartimentalización celular, y se denominan: clase I, citosólicas; clase II, mitocondriales y clase III, microsomales y tumorales (Lindahl y Hempel, 1991). Existen también ALDHs

que requieren un sustrato específico, entre las que encontramos a la semialdehído deshidrogenasa del succinato (Niegmann *et al.*, 1992), la semialdehído deshidrogenasa del glutamato (Krzywicki *et al.*, 1984), así como la betaina aldehído deshidrogenasa (Nagasawa *et al.*, 1976; Falkenberg *et al.*, 1990).

En 1949 por primera vez se demostró la existencia de una ALDH en el hígado de bovino (Racker, 1949). No fue sino hasta 1970 cuando se purificó por primera vez una ALDH de levadura y hasta 1972 que esta meta se logró con la enzima de un mamífero (Feldman y Weiner, 1972).

La primera secuencia de aminoácidos de una ALDH se conoció en 1984 (Hempel *et al.*, 1984) y es gracias a estos estudios de secuenciación a nivel proteico, o a nivel de los genes o los cDNAs que codifican estas enzimas, que actualmente se conoce la secuencia aminoacídica de más de 200 ALDHs de animales, hongos, protozoarios y bacterias (Perozich *et al.*, 1999). En un principio se comparó un pequeño número de estas secuencias (sólo 16), encontrándose que de aproximadamente 500 aminoácidos que conforman una subunidad, únicamente 23 están conservados (Hempel *et al.*, 1993); algunos de éstos podrían ser componentes del sitio activo. Hasta ahora, se han alineado alrededor de 200 secuencias aminoacídicas y se han descubierto 10 motivos conservados que contienen todos los residuos completamente conservados, así como la mayoría de los residuos que están presentes en el 95% de las secuencias comparadas. La alineación de las más de 200 secuencias se ha utilizado para crear una filogenia genética.

Los estudios cinéticos realizados con distintas ALDHs señalan que muchas de estas enzimas tienen un mecanismo cinético ordenado, en el que el nucleótido es el primer sustrato (Weiner *et al.*, 1995). El mecanismo químico que se ha propuesto para explicar cómo funcionan las ALDHs consiste en una catálisis covalente en donde se realiza un

ataque nucleofílico del grupo tiol de un residuo de cisteína conservado sobre el carbono del grupo carbonilo del aldehído, para que después el tiohemiacetal formado sea oxidado a un tioéster (Weiner *et al.*, 1995) (Fig. 5). El sitio activo posee una base general que ayuda en el proceso de desacilación del intermediario tioéster.

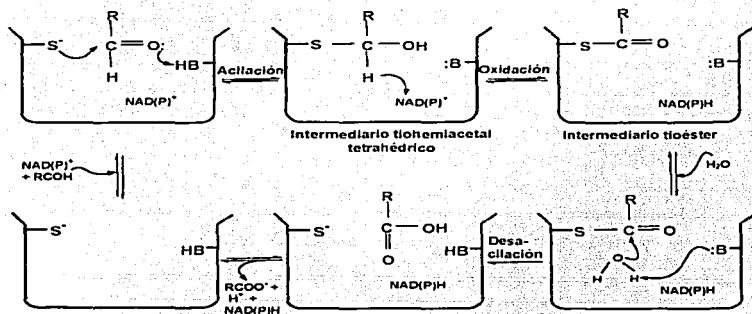


Figura 5. Esquema simplificado del mecanismo de reacción de las aldehídos deshidrogenasas.

Los estudios de mutagénesis dirigida a un sitio específico realizados con la ALDH de mitocondria de hígado de mamífero indicaron que la cisteína 302 es el residuo nucleofílico del sitio activo y que el glutamato 268 es la base general necesaria para la activación inicial de la cisteína 302, más que para la desacilación antes mencionada (Farres *et al.*, 1995; Wang y Weiner, 1995). Otra investigación más reciente, utilizando también análisis de mutaciones sitio-dirigidas, muestra que los cambios en el glutámico 399 y en la lisina 192,

que se enlazan a los anillos de la ribosa del nucleótido (Steinmetz *et al.*, 1997), provocan que el paso limitante de la ALDH de la mitocondria de hígado de humano cambie de ser la desacilación a ser la transferencia del hidruro desde el tiohemiacetal al nucleótido oxidado (Sheik *et al.*, 1997). Estos dos aminoácidos parecen estar involucrados en la estabilización del estado de transición a través de su unión con la ribosa (Ni *et al.*, 1997).

En los últimos años también se han determinado las estructuras tridimensionales de algunas ALDHs: ALDH 2 de bovino, un tetrámero (Liu *et al.*, 1997); ALDH 3 de rata, un dímero y ALDH 9 de bacalao, un tetrámero con actividad BADH (Johansson *et al.*, 1998). Se ha encontrado que a pesar de que difieren en sus estructuras primarias y cuaternarias y en el tamaño de su subunidad, todas ellas tienen una estructura tridimensional similar. Estas enzimas poseen tres dominios distintos en cada subunidad: un dominio de unión a la coenzima que tiene una estructura $\alpha\beta$ 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. Sin embargo, las dos enzimas tetraméricas (ALDH 2 y 9) difieren de la dimerica (ALDH 3) en la forma en que unen el NAD(P)^+ .

La única estructura que se conoce de enzimas con actividad BADH es la de la BADH de hígado de bacalao, que es similar a las de las otras ALDHs conocidas, y se muestra en la

Fig. 6.

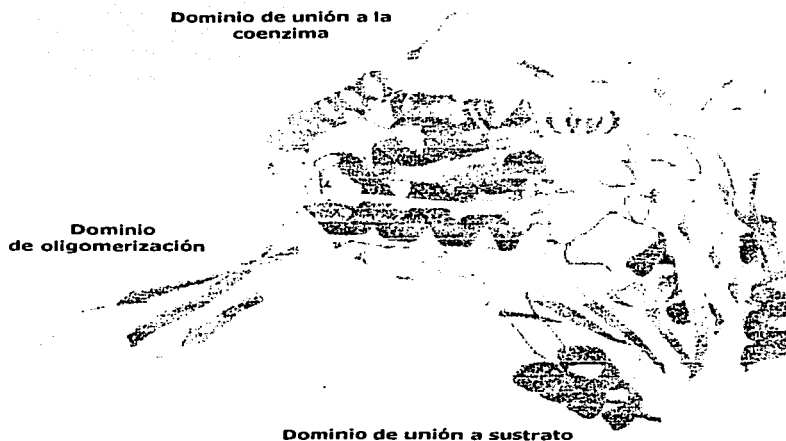


Figura 6. Organización de los dominios de un monómero de la BADH de hígado de bacalao (Johansson *et al.*, 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11.4 BETAÍNA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA

Una ALDH cuyo papel es trascendental en la adaptación de organismos al estrés ambiental es la BADH (EC 1.2.1.8 betaina aldehído: NAD⁺ oxidoreductasa). Esta enzima se involucra en la síntesis de GB, catalizando la siguiente reacción:



Figura 7. Reacción catalizada por la enzima betaina aldehído deshidrogenasa.

La expresión de BADH en *E. coli* se estimula por el estrés osmótico (Styrvoid *et al.*, 1986). En plantas, la oxidación de la colina hasta glicina betaina se realiza en el cloroplasto (Hanson *et al.*, 1985). La aplicación de un déficit hídrico a las hojas de *A. hypochondriacus*, L. produce un incremento en la actividad de la BADH, desde niveles no detectables hasta 1 unidad por mg de proteína (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, R.A., 1994). Por otro lado, la salinización gradual de las plantas de *Spinacia oleracea* lleva a un aumento del 300% en esta actividad (Weigel *et al.*, 1986). Consistente con estos resultados, el rNAm y la proteína BADH también se acumulan en *S. oleracea* bajo tensión salina (Weretilnyk y Hanson, 1989) y en *A. hypochondriacus* en respuesta al déficit de agua o altas concentraciones de NaCl (Legaria *et al.*, 1998). En plantas de *Hordeum vulgare*, en las que la salinización produce un aumento de tres veces en la actividad de la BADH (Arakawa *et al.*, 1990), el incremento en los niveles de esta proteína se da no sólo por la adición de

NaCl al medio de crecimiento sino también por déficit hídrico provocado por la presencia de polietilenglicol (Arakawa *et al.*, 1992).

Después de analizar y comparar la secuencia de 11 enzimas BADH de diversos orígenes mediante un programa de cómputo, se han encontrado que 89 residuos de aminoácidos (17.8%) de los aproximadamente 500 que conforman la subunidad de estas enzimas, están conservados (Velasco-García, 2000). Entre estos 89 residuos de aminoácidos destaca una región de 10 residuos altamente conservada Val-Thr-Leu-Glu-Leu-Gly-Gly-Lys-Ser-Pro, así como también un residuo de cisteína localizado a 34 residuos de este decapeptido (Weretilnyk y Hanson, 1990), que se consideran parte fundamental del sitio activo de la enzima y del sitio de unión al cofactor, así como los residuos que estabilizan el estado de transición de la BADH.

II.4.1 Propiedades moleculares

Las BADHs de plantas que han sido caracterizadas son homodímeros, compuestos de dos subunidades derivadas de un mismo gen nuclear (Weretilnyk y Hanson 1988). La longitud del precursor no procesado de la BADH de amaranto es de 501 aminoácidos y tiene una masa molecular de 54 503 Da (Legaria *et al.*, 1998). Por similitud con otras proteínas que se dirigen al cloroplasto se ha sugerido que los aminoácidos del 1 al 7 constituyen el péptido de tránsito, aunque no se ha podido secuenciar la región N-terminal debido a que el primer residuo de aminoácido de la proteína está bloqueado. La BADH de amaranto consta de 494 residuos por subunidad que, al igual que en el resto de las ALDHs, se agrupan en tres dominios: dominio catalítico, dominio de unión a NAD(P)⁺ y dominio de asociación.

Figura 8. Secuencia de aminoácidos a partir de cDNA de la BADH de hoja de *A.*

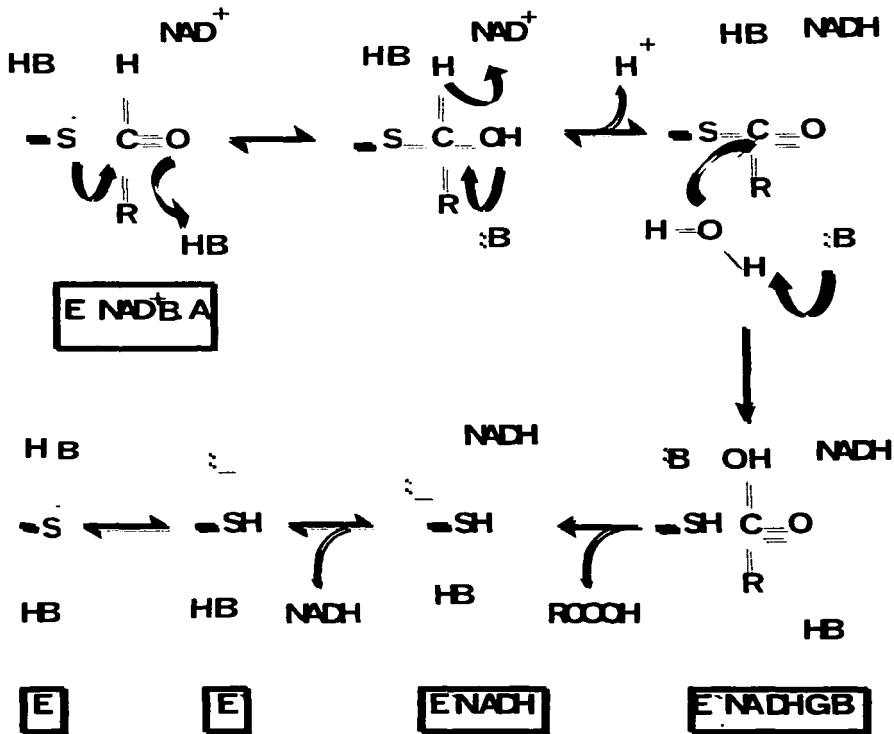
hypochochriacus L. (Legaria *et al.*, 1998).

10	20	30	40	50	60
MAIRVPSRQL	FIDGEWREPI	KKNRIPINP	STEEIGDIP	AATAEDVELA	VAAARRALKR
70	80	90	100	110	120
NKGEDWASAS	GAHRAKYLRA	IAAKITEKDD	YFAKLEAMDC	GKPLDEAARD	IDDVAGCFEY
130	140	150	160	170	180
YADQAEALDA	KQKAPIALPM	DTFKCHVLKQ	PIGVVGLISP	WNYPLLMTW	KVAPALAAGC
190	200	210	220	230	240
SAVLKPELSA	SVTCLELAEV	CREVGLPPGV	LNILTGLGPE	AGGPLACHPD	VDKVAFTGST
250	260	270	280	290	300
ATGSKVMSSA	AQLVKPVTLE	LGGKSPVIF	EDVDLDKAAE	WTAFGCFWTN	GQICSATSRL
310	320	330	340	350	360
LVHESIAAEF	LDRLVKWCKN	IKISDPFEEG	CRLGPVVSKS	QYEKVLKFKIS	TAKSEGATIL
370	380	390	400	410	420
CGGSRPEHLK	KGYVVEPTII	SDVSTSMQIW	REEVFGPVLC	QKTFGSEDEA	IELANDTQYG
430	440	450	460	470	480
LGAAVLSKDL	DRRCERITKAL	EVGAVVWVNC	QPCFTQAPWG	GTKRSGFGRE	LGEWGIENYL
490	500				
NIKQVTRDTS	TDEPWGWYKS	P			

II.4.2 Mecanismo cinético y de reacción

El mecanismo de reacción de la BADH de amaranto se presenta en la Figura 9. En analogía con todas las ALDHs estudiadas, la cisteína esencial (Cys 294) realiza un ataque nucleofílico sobre el sustrato aldehído formando un intermediario covalente, un tiohemiacetal.

Figura 9. Mecanismo de reacción propuesto de la BADH de *A. hypochondriacus* L.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A diferencia de las ALDHs de hígado de mamífero han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, son pocos los estudios cinéticos que se han realizado con la BADH de plantas y microorganismos.

Se han reportado tres diferentes mecanismos para las BADHs de diferentes fuentes:

- ❖ Ping pong para las enzimas de *Escherichia coli* (Falkenberg y Strom, 1990).
- ❖ Iso BI BI ordenado en estado estacionario para las enzimas de hojas de amaranto (Fig. 10) y de riñón de cerdo (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993; Figueroa-Soto y Valenzuela-Soto, 2000), que se convierte en BI BI al azar en estado estacionario a altas concentraciones del sustrato aldehído (Vojtechová *et al.*, 1997).
- ❖ BI BI al azar en el estado estacionario para la BADH de *P. aeruginosa* (Velasco-García *et al.* 2000).

La enzima de amaranto, al igual que la ALDH de mamífero, presenta un mecanismo ordenado en el que el NAD^+ es el primer sustrato en unirse y el NADH es el último producto en disociarse de la enzima. Sin embargo, en forma diferente a todas las ALDHs estudiadas, el mecanismo cinético de la BADH de *A. hypochondriacus* es de tipo Iso, en el que existen dos formas interconvertibles de la enzima libre, que unen al NAD^+ y al NADH respectivamente (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). Por otra parte, se ha encontrado que el paso limitante de la reacción ocurre después de la transferencia del hidruro del sustrato aldehído a la coenzima oxidada (Muñoz-Clares y Mújica-Jiménez, 2001).

En el caso de los mecanismos Iso, el paso de la isomerización de la enzima libre se ha propuesto con base en tres observaciones: la adición ordenada de los sustratos a la enzima, siendo el NAD^+ el primer sustrato en combinarse, la irreversibilidad de la reacción y la inhibición no competitiva del NADH frente al NAD^+ .

Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994), se ha propuesto que podría ser un punto importante de regulación de la síntesis de GB a nivel fisiológico.

11.5 MODIFICACIÓN QUÍMICA DE PROTEÍNAS

Las enzimas representan una de las más diversas y sorprendentes biomoléculas presentes en los organismos. Su especificidad y sus mecanismos de acción y de regulación constituyen un amplio campo de investigación. Su estudio puede abordarse desde diferentes puntos de vista, por ejemplo: el cinético, el estructural y el termodinámico. Un estudio detallado de la función de los residuos importantes en la catálisis y unión de ligandos de una enzima involucra su modificación. Hay dos formas de modificar una enzima, se puede alterar racionalmente el gen que la codifica por mutagénesis-sitio dirigida, o bien se puede actuar químicamente sobre la proteína, alterando específicamente las cadenas laterales de algunos residuos por modificación química. La mutagénesis dirigida se ha utilizado principalmente en la identificación de los sitios ligantes o catalíticos de las enzimas y en el análisis de su función. La modificación química es una herramienta poderosa que se ha utilizado para mapear sitios ligantes de las proteínas y es una técnica que nos permite obtener información valiosa acerca de una proteína, incluso cuando no conozcamos ni su estructura ni su secuencia. Actualmente, la mutagénesis dirigida es la técnica más empleada en estudios de correlación estructura – función; sin embargo, en los últimos años se sigue mostrando que la modificación química es un área activa ya que todos los años aparecen métodos y reactivos nuevos (Montero-Morán *et al.*, 2001). La mutagénesis dirigida y la modificación química tienen una diferencia esencial. La primera nos permite crear una enzima mutante

que se podrá comparar con la enzima silvestre. La modificación química también nos da una enzima modificada, pero nos da una información adicional que suele ser la más valiosa, la cinética de la reacción de modificación, que indica la reactividad del grupo del residuo de aminoácido modificado. Ésta se puede estudiar mientras transcurre la reacción y nos puede dar mucha información sobre el papel de este residuo en la función de la proteína, particularmente si se trata de un residuo catalítico. 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.

En concreto, el uso combinado de las dos técnicas, modificación química y mutagénesis dirigida, aunado si es posible a buenos datos cristalográficos, puede ser la forma más completa de dilucidar la relación estructura-función de una enzima.

II.5.1 Técnica de modificación química.

Las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de las proteínas reaccionan con una gran variedad de reactivos químicos para formar enlaces covalentes. En general, los reactivos tienden a ser no específicos y pueden reaccionar con cualquier residuo aminoácido que tenga la naturaleza química apropiada. La modificación covalente de una enzima puede conducir a una pérdida irreversible de la actividad si un residuo esencial catalíticamente es bloqueado, o si la unión del sustrato es impedida estéricamente, o si la proteína sufre un cambio conformacional o su movilidad se ve afectada. Alternativamente, la modificación puede no afectar la actividad si se modifica un residuo de poca importancia, o si la inhibición es transitoria debido a que la modificación química fuese de carácter reversible.

El objetivo de esta técnica de estudio de proteínas es modificar residuos de forma covalente, ya sea para obtener y proveer información mecanística, o bien para producir alteraciones de la actividad. Además, se conocen diversas aplicaciones de esta técnica; por citar algunos ejemplos tenemos: la medición del grado de exposición de grupos de los residuos de aminoácidos de las enzimas a los disolventes; la medición de los valores pK_a y estados iónicos de los grupos reactivos a partir de la dependencia de pH de sus reactividades; el establecimiento de los grupos que son importantes en la catálisis al notar el efecto de la modificación sobre las velocidades de la reacción y la inhibición irreversible de la actividad por modificación química.

11.5.2 La reactividad química de los residuos de cisteína

Los principales grupos químicamente reactivos en las proteínas son *nucleófilos*. Éstos son generalmente los mismos grupos que se encuentran en los sitios activos de las enzimas y que son responsables de la catálisis. Por citar algunos, tenemos el grupo hidroxilo del residuo de serina (serin proteasas, colinesterasas, esterasas, lipasas) y el grupo tiol del residuo de cisteína (proteasas, aldehído deshidrogenasas). El grupo imidazol del residuo de histidina generalmente funciona como un catalizador ácido - base que incrementa la nucleofilicidad de los grupos hidroxilo y tiol, pero algunas veces actúa propiamente como un nucleófilo con el grupo fosforilo en la transferencia de fosfatos. Estos nucleófilos son además reactivos en diferentes grados hacia electrófilos suaves, por consecuencia, la mayoría de los reactivos que se usan para modificar químicamente a las proteínas son electrófilos. El grupo tiol de los residuos de cisteína es el nucleófilo más potente de los tres mencionados.

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, por lo que 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 papaina 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 (Polgar, 1976). Este mecanismo de activación del tiol catalítico se ha encontrado posteriormente en otras enzimas, como la betaina aldehído deshidrogenasa (González-Segura *et al.*, 2002). 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 terminal de una α 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 (Wang y Weiner, 1995).

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 sulfinico (-SO₂H), el ácido sulfónico (-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 pueden ser revertidos por agentes reductores, mientras que los otros dos estados de oxidación, ácidos sulfinico y sulfónico, no pueden ser reducidos a cisteína (Fig. 11). 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 (Denu y Tanner, 1998).

11.5.3 Reactivos específicos de grupos tiol

Una sustancia que puede reaccionar con grupos sulfhidrilo y por lo tanto alterar procesos enzimáticos, metabólicos o funcionales es en general llamado **reactivo específico de grupos tioles**. Como ya se ha mencionado, el grupo -SH prontamente dona pares de electrones y por ello es uno de los grupos de las enzimas más reactivo para la formación de enlaces covalentes.

Las reacciones de la mayoría de reactivos específicos de grupos tiol con otros tioles dependen del pH y esto indudablemente se relaciona con la ionización de ambos, el reactivo específico de tioles y los grupos sulfhidrilos de la enzima.

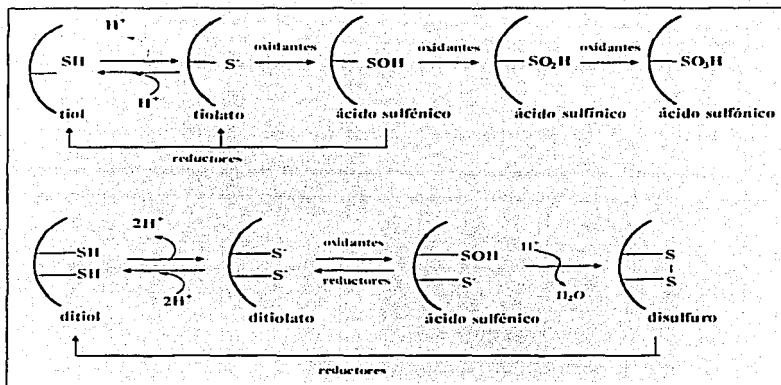


Figura 11. Estados de oxidación del grupo tiol de la cisteína.

Hasta la fecha se sabe que el disulfiram y algunos de sus derivados son inhibidores, en mayor o menor grado, de diversas ALDHs tales como:

- ❖ ALDH citosólica y constitutiva (recombinante y no recombinante) de hígado de ratón (Kathmann *et al.*, 2000; Mays *et al.*, 1994).
- ❖ ALDH citosólica y mitocondrial (recombinante y no recombinante) de origen humano (McKerell, 1985; Lam *et al.*, 1997).
- ❖ ALDH citoplásmica de hígado de oveja y caballo (Kitson, 1982; Kitson, 1987).

En relación al efecto que el DSF tiene específicamente sobre las BADHs, se ha encontrado que la enzima de hígado humano es, *in vitro*, insensible a este compuesto (Kurys *et al.*, 1989). Sin embargo, no se ha investigado hasta la fecha el efecto que este compuesto tiene sobre otras BADHs, concretamente la de plantas.

II.6.2 Mecanismo de inhibición de las ALDHs por disulfiram

El DSF actúa formando un disulfuro mixto con la cisteína esencial que reside en el sitio activo, aunque también puede formarse un disulfuro intramolecular si existe otro residuo de cisteína próximo al catalítico (Fig. 13). Por ejemplo, se sabe que *in vitro* el DSF actúa oxidando a las cisteínas contiguas que residen en el sitio activo de la ALDH de levadura (Veverka *et al.*, 1997). La formación del puente disulfuro inhibe la actividad de la enzima por la modificación del grupo -SH de la cisteína esencial (C302 en la ALDH de levadura). El mismo mecanismo se ha encontrado para la ALDH de mitocondria de hígado de rata (ALDH 2) (Lipski *et al.*, 2001). Se ha observado que la recuperación de la actividad

enzimática se alcanza con un tratamiento con ditioneitol (DTT), el cual reduce el puente disulfuro intramolecular (Fig. 13).

No obstante, se sabe que el DSF tiene una vida media muy corta *in vivo* para inhibir directamente a la ALDH, pero que es biotransformado a metabolitos reactivos que son los inhibidores directos de la enzima.

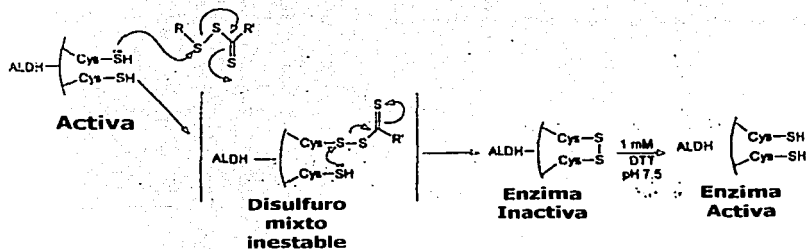


Figura 13. Mecanismo propuesto de la inhibición de ALDH de levadura después de un tratamiento *in vitro* de la enzima con DSF, así como su reactivación después de un tratamiento con DTT 1 mM a pH 7.5 (Veverka *et al.*, 1997).

Como se mencionó, el DSF, hipotéticamente, inhibe a la ALDH *in vitro* por la formación de puentes disulfuro mixtos o intramoleculares con los grupos sulfhidrilo esenciales de la enzima. Sin embargo, es poco probable que *in vivo* el DSF inhiba a la enzima, porque este compuesto es reducido muy rápidamente por la glutatión reductasa en eritrocitos, dando lugar al *N,N*-dietilditiocarbamato (DDC). El DDC es un inhibidor muy débil de la enzima ALDH *in vitro*, sugiriendo que se requiere de un metabolismo posterior para generar un compuesto que inhiba esta enzima. Actualmente se piensa que el DDC es metilado a la forma *S*-metil *N,N*-dietilditiocarbamato (MeDDC), el cual es activado metabólicamente por

desulfuración oxidativa y sulfoxidación formando por una parte MeDDC sulfóxido y por otra *N*-metil *N,N*-dietiltiocarbamato (MeDTC) y MeDTC sulfóxido. Finalmente, ocurre la oxidación metabólica del MeDTC sulfóxido a MeDTC sulfona, siendo estos compuestos los que se han propuesto como los responsables de la inhibición de la ALDH *in vivo*, tras ingerir DSF (Mays *et al.*, 1994) (Fig. 14).

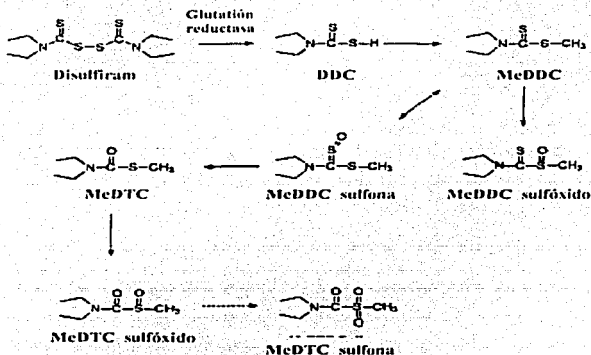


Figura 14. Metabolismo del disulfiram (Mays *et al.*, 1998).

11.6.3 Análogos del disulfiram inhibidores de las ALDHs

Los herbicidas tiocarbamatos y sus metabolitos son similares al DSF y sus metabolitos, no sólo por poseer una estructura homóloga sino también por su potencial como inhibidores de ALDHs *in vivo*. Específicamente, se han probado en la ALDH mitocondrial de baja K_m de hígado de ratón (Quistad *et al.*, 1994). Cabe destacar que los herbicidas tiocarbamatos son de gran importancia debido a que son una de las principales clases de agroquímicos que se

emplean anualmente (en Estados Unidos). Los herbicidas de esta clase incluyen compuestos como: *N*-etil *N,N*-dipropiltiocarbamato (EPTC), tiobencarb, pebulato, vernolato, molinato, butilato y trialato. Así mismo, el tiram es el homólogo tetrametil del DSF y un importante fungicida, que inhibe también a las ALDHs. De hecho, se recomienda a los agricultores el evitar ingerir alcohol durante o después de una exposición a este disulfuro ditiocarbamato. Por otra parte, existen reportes de que el metabolito sulfóxido del herbicida tiocarbamato EPTC es convertido a su sulfona correspondiente en cromosomas de hígado de ratón (Mays *et al.*, 1994), al igual que ocurre la oxidación metabólica de los derivados de DSF hasta MeDTC sulfona, siendo precisamente este compuesto uno de los que se ha propuesto como responsable de la inhibición de la ALDH *in vivo*. Los sulfóxidos tiocarbamatos se descubrieron como metabolitos de los herbicidas tiempo antes de que este tipo de químicos se reconocieran como metabolitos del DSF (Quistad *et al.*, 1994).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Resulta sorprendente que las ALDHs de diferentes orígenes posean diferente sensibilidad al DSF. Puesto que todas ellas requieren de un residuo de cisteína muy reactivo para su actividad, y dado que el DSF es un reactivo específico de grupos sulfhidrílo, es claro que ciertos condicionamientos estructurales deben afectar la reactividad del residuo de cisteína esencial frente a este compuesto. Por ello es de interés, no sólo desde el punto de vista práctico sino también básico, el estudio del efecto de este compuesto sobre la enzima BADH de amaranto para elucidar diferencias entre las propiedades funcionales y estructurales de BADHs de distintos orígenes, bacteriano, vegetal y animal. Para ello y, para investigar más a fondo las propiedades de la cisteína esencial, tales como su reactividad y el mecanismo de reacción, en este trabajo estudiamos el efecto del disulfiram sobre la enzima de hoja de amaranto. Por otro lado, el hecho de que los sustratos NAD(P)^+ y BA y los productos NAD(P)H protejan a esta enzima de modificadores químicos específicos de cisteínas (González-Segura *et al.*, 2002) nos llevó a preguntarnos si podrían actuar de la misma forma ante la posible inhibición por DSF. Así mismo, resulta de interés el conocer si la inhibición por DSF, en caso de que ocurriese, se podría revertir por agentes reductores fisiológicos como glutatión reducido, tioredoxina, o no fisiológicos como 2-mercaptoetanol o DTT.

IV. HIPÓTESIS

La BADH de hoja de amaranto presenta en su sitio activo un residuo de cisteína esencial para la catálisis y dado que el disulfiram es un reactivo específico de grupos tioles, se observará un proceso de inactivación de la enzima en presencia de DSF. Se espera que este efecto inhibitorio se modifique dependiendo del ligando presente (sustrato, coenzima reducido y oxidado). Además, puesto que la enzima posee otros 15 residuos de cisteína, si éstos se modifican podrían afectar la estabilidad de la estructura nativa.

V. OBJETIVOS

V.1 OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Investigar si el DSF inactiva y/o desestabiliza a la BADH de hojas de amaranto.

V.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Investigar el efecto que tiene el DSF sobre la actividad de la enzima, determinando el orden y la constante de velocidad del proceso de inactivación, si ésta se produce.
2. Investigar si la presencia de la coenzima oxidada o reducida, o del sustrato aldehído, altera el valor de la constante de inactivación.
3. Investigar la reversibilidad de la modificación por DSF por agentes reductores fisiológicos y no fisiológicos.
4. Determinar si la modificación química por DSF afecta la estructura nativa de la enzima BADH.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Las plantas de *A. hypochondriacus* L. crecieron en un invernadero iluminado con luz natural a una temperatura entre 18 – 30° C. Se usaron plantas de 6 a 8 semanas de crecimiento para la purificación. Las hojas intactas se separaron y se sometieron a un estrés hídrico por exposición directa al sol por alrededor de 2 horas en el invernadero.

VI.2 EQUIPO Y REACTIVOS

EQUIPO

Centrífuga Sorvall RC-5 Plus

Ultracentrífuga Sorvall

Potenciómetro Beckman

Equipo de electroforesis Hoefer Scientific

Espectrofotómetro Beckman DU 7500 con
baño recirculante a temperatura controlada

Transiluminador de luz blanca

Columnas para cromatografía de Biorad

Columna Mono-Q Pharmacia

Columna Superdex 200 Pharmacia

Colector de fracciones Pharmacia LKB.

Balanza analítica Ohaus.

Vortex Thermolyne.

Cámara de agitación orbital con temperatura
controlada Lab Line instruments.

HPLC (high performance liquid
chromatography) Waters

REACTIVOS

Ácido acético Merck

Ácido cítrico Merck

Glutatión reducido Sigma

Hidróxido de amonio Sigma

Ácido clorhídrico Merck	Hidróxido de potasio Sigma
Acrilamida Sigma	Hidróxido de sodio Sigma
Betaina aldehído Sigma	2-mercaptoetanol Sigma
Bis-acrilamida Sigma	Metanol Merck
BSA (albúmina sérica bovina) Gibco BRL	NAD ⁺ Sigma
Cloruro de potasio Sigma	NADH Sigma
Disulfiram Sigma	Nitrato de plata sigma
DTT (ditiotreitól) Sigma	Reactivo de Bradford de BIO-RAD
EDTA Merck	SDS (dodecil sulfato de sodio) Sigma
Etanol absoluto Merck	Sefàrosa 5'-AMP Pharmacia
Formaldehído Merck	Sefadex G-25 Bio Rad
Fosfato monobásico de potasio Merck	Sefarosa Q de flujo rápido Pharmacia
Fosfato dibásico de potasio Merck	Sulfato de amonio ultrapuro Gibco BLR
Glicerol Merck	Tris (hidroximetil-aminometano) Sigma
Glicina Sigma	
HEPES (N-{2-hidroxietil}piperi-zina-N'-{ácido 2 etanosulfónico}) Sigma	

VI.3 METODOLOGÍA

VI.3.1 Extracción y purificación de la BADH

La BADH se obtuvo usando un protocolo de purificación puesto a punto en nuestro laboratorio (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). Las hojas estresadas hídricamente se homogenizaron en una licuadora comercial en una relación de 250 g tejido/400 mL de

amortiguador A: HEPES-KOH 50 mM, pH 7.4, EDTA 1mM, glicerol 10% (v/v), y β -mercaptoetanol 10 mM (el reductor se adiciona al momento). El homogenizado se pasó a través de 6 capas de gasa y se centrifugó a $7,824 \times g$ por 30 min. Al sobrenadante se le adicionó sulfato de amonio sólido para lograr una saturación del 30% y posteriormente se centrifugó a $25,348 \times g$ durante 30 minutos. El sobrenadante se llevó entonces a un 75% de saturación con sulfato de amonio; la proteína precipitada se separó por centrifugación como se indica arriba. El precipitado se resuspendió en el amortiguador A y, con la finalidad de eliminar completamente los restos de tejido de las hojas, se sometió a una ultracentrifugación a $104,958 \times g$ por 30 min. Posteriormente, el sobrenadante fue desalado por una filtración en gel a través de una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia) que fue equilibrada y eluida con el mismo amortiguador de la resuspensión. Esta solución fue entonces aplicada a una columna de intercambio iónico de Sefarosa-Q de flujo rápido (Pharmacia) (1.8×6.35 cm) equilibrada con el mismo amortiguador. Después de lavar la columna, la enzima fue eluida con un gradiente de cloruro de potasio (0-500 mM) en el amortiguador A a un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones que presentaban actividad enzimática fueron recolectadas y después desaladas en una columna de Sephadex G-25 equilibrada y eluida con un amortiguador de fosfatos de potasio 20 mM (monobásico y dibásico), pH 6.5, EDTA 0.1 mM, glicerol 10% (v/v) conteniendo 10 mM de β -mercaptoetanol (amortiguador B). La preparación desalada se aplicó a una columna de afinidad de 5'AMP Sefarosa (Pharmacia) (1 mL de volumen de cama) equilibrada con el amortiguador B. Después de un lavado con el mismo amortiguador que se equilibró la columna, la enzima se eluyó con un gradiente de AMP (0-0.2 mM) a un flujo de 0.5 mL/min; las fracciones que presentaron actividad enzimática se recolectaron. Un paso

adicional de purificación fue necesario para la eliminación de contaminantes menores el cual consistió en una cromatografía de intercambio iónico de la preparación enzimática a través de una columna de intercambio iónico Mono-Q HR (Pharmacia) acoplada a un sistema de HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) (Waters) equilibrado con HEPES - KOH 50 mM, pH 7.5, EDTA 1mM, glicerol 10% (v/v) y β -mercaptoetanol 10 mM, la enzima fue eluida con una gradiente de cloruro de potasio (0-500 mM) en el mismo amortiguador. La enzima eluye a una concentración de 180 mM de KCl. Finalmente, la enzima tal como se obtiene del último paso de purificación se alícuotó y se mantuvo a -70° C hasta su uso. Todo el procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente excepto los pasos de extracción y cromatografía de intercambio iónico que se realizaron a 4° C.

VI.3.2 Determinación de proteína.

La cuantificación de proteína se realizó mediante un ensayo basado en el método de Bradford (1976). Éste se fundamenta en el cambio de color diferencial del Azul Brillante de Coomassie en respuesta a varias concentraciones de proteína. El máximo de absorbancia para este colorante cambia de 465 nm a 595 nm cuando se une a la proteína. El colorante azul de Coomassie reacciona principalmente con residuos de aminoácidos básicos, especialmente arginina, y aromáticos. La proteína estándar usada fue la albúmina sérica de bovino (BSA). La curva patrón se realizó a diferentes concentraciones, en un intervalo de 0-40 μ g encontrándose una dependencia lineal entre el color desarrollado por las muestras y su concentración de BSA.

Curva Patrón de BSA

Tubo	[BSA] (μg)	BSA* (μL)	Agua destilada (μL)	Reactivo Bradford** (mL.)
1	0	0.0	50.0	5
2	5	3.6	46.4	5
3	10	7.2	42.8	5
4	15	10.8	39.2	5
5	20	14.4	35.6	5
6	30	21.6	28.4	5
7	40	28.8	21.2	5

*Solución madre de BSA: 1.39 mg/mL. ** Reactivo de Bradford de BIO-RAD diluido (1:5).

Después de añadir el colorante, se agitó en vortex y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo de la coloración; se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro. Se realizaron las diluciones necesarias de la muestra problema hasta obtener una D.O. que se interpolara en la curva patrón.

VI.3.3 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida

Con la finalidad de evaluar la pureza de la preparación final de la enzima, la solución enzimática se sometió a una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970). Bajo estas condiciones desnaturalizantes, la migración de las proteínas se determina por su peso molecular, no por su carga.

El SDS es un detergente que confiere a las proteínas una carga neta negativa. Este efecto, unido al tratamiento con un agente reductor (β -mercaptoetanol), hace que las proteínas se comporten como partículas lineales con igual densidad de carga. El gel de poliacrilamida consta de dos zonas: una zona de concentración (4% acrilamida, pH 6.8) y otra donde se

lleva a cabo la separación de las proteínas (10% acrilamida, pH 8.3). El revelado de las bandas de proteína se llevó a cabo por tinción con plata (Wray *et al.*, 1981).

La preparación del gel para la electroforesis SDS-PAGE se realizó de la siguiente manera:

	Gel separador (10% acrilamida)	Gel apilador (4% acrilamida)
30 % acrilamida (I)	3.33 mL.	0.67 mL.
Amortiguador para gel separador (II)	2.50 mL.	---
Amortiguador para gel apilador (III)	---	1.25 mL.
SDS 10% (IV)	0.10 mL.	0.05 mL.
Agua desionizada	1.00 mL.	3.00 mL.
Persulfato de amonio (V)	0.10 mL.	0.10 mL.
TENED	0.013 mL.	0.013 mL.
Volumen final	10 mL.	5 mL.

*Es el último en adicionarse

El gel separador se aplicó rápidamente entre las placas de vidrio y se dejó gelificar. Posteriormente, se adicionó el gel apilador. En cada carril se aplicaron 10 μ L de las muestras. La concentración de proteína de la enzima purificada que se aplicó fue de 0.2 μ g/ μ L. Las proteínas que se utilizaron como estándares M_r (kDa) fueron: miosina (220), α 2-macroglobulina (170), β -galactosidasa (116), transferrina (76) y glutámico deshidrogenasa (53).

La composición de las soluciones empleadas es la siguiente:

- I) Acrilamida 30 % (p/v), bis-acrilamida 2.7 % (p/v).
- II) Amortiguador para gel separador: Tris 1.5 M, ajustado a pH 8.8 con HCl concentrado.
- III) Amortiguador para gel apilador: Tris 0.5 M, ajustado a pH 6.8 con HCl concentrado.
- IV) SDS 10 %: dodecil sulfato de sodio 10 % (p/v).
- V) Persulfato de amonio 10% (p/v).

- VI) Amortiguador para la muestra 2X: Tris 0.125 M, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v).
- VII) Amortiguador para electrodos pH 8.3: Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v).

Revelado con plata. El gel se incubó con metanol al 50% (v/v) durante 15 minutos, tras lo cual se realizaron tres lavados de 5 minutos con agua destilada. A continuación se colocó en la solución de complejo de plata (solución A) y se mantuvo en agitación suave durante 15 minutos. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con agua destilada en agitación constante. Posteriormente el gel se incubó en una solución de formaldehído (solución B) hasta la aparición de las bandas (5-10 minutos). La reacción se detuvo lavando con agua destilada.

A) Solución de complejo de plata para revelado. Se prepara una solución de 0.4 g de AgNO_3 en 4 mL de agua y una solución de 21 mL de NaOH 0.36 % y 2.75 mL de NH_4OH al 30%. A la mezcla de NaOH y NH_4OH se agrega gota a gota la solución de plata con agitación. Se aforó a 100 ml.

B) Solución de formaldehído para revelado. Se preparan 2.5 mL de una solución al 1% de ácido cítrico y se le adicionan 270 μL de formaldehído al 35%. Se afora a 500 mL.

VI.3.4 Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la enzima se midió mediante un ensayo espectrofotométrico estándar ya descrito (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). La oxidación de la betaina aldehído por la BADH y el NAD^+ da como resultado glicina betaina y NADH. Al tratarse de una reacción de estequiometría 1:1, la aparición de NADH es proporcional a la aparición de

glicina betaina y, por lo tanto, a la actividad enzimática. Siendo éste el fundamento, la actividad enzimática de la BADH se determinó espectrofotométricamente midiendo la aparición de NADH por medio del incremento en la extinción a 340 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 7500. La temperatura se mantuvo a 30 °C usando un baño de agua recirculante. El ensayo de actividad se realizó en el amortiguador Hepes-KOH 100 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM, NAD⁺ 0.5 mM, BA 0.2 mM, en un volumen final de 0.5 mL. Estas concentraciones de sustratos son saturantes para la enzima al pH que se realiza el ensayo enzimático. La reacción se inició con la adición de la enzima (10 µL de una preparación enzimática de 0.2 µg/µL) y se midió el cambio en la extinción obtenida durante 90 ó 120 s. La reacción es lineal en este intervalo de tiempo.

La actividad enzimática de la BADH se calculó de la siguiente manera:

$$A.E. = \Delta A \times \frac{1}{\epsilon} \times \frac{1}{V}$$

En donde,

A.E. = actividad enzimática (mU/mL)

ΔA = incremento de la absorbancia a 340 nm

ϵ = coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm ($6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

V = volumen de enzima usado en el ensayo.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad necesaria para convertir 1 µmol de sustrato en producto en un minuto bajo nuestras condiciones experimentales, a 30 °C y pH 8.0.

VI.3.5 Estudios cinéticos de inactivación de la BADH por DSF

Se incubaron alícuotas de la enzima pura (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) con DSF y se evaluaron las cinéticas de inactivación, determinando el orden de reacción y las constantes de velocidad correspondientes, siguiendo el curso temporal de la pérdida de actividad de la enzima. Se investigó el efecto de los ligandos de la enzima sobre la cinética de modificación haciendo incubaciones en presencia de concentraciones saturantes de éstos.

Previamente al tratamiento con DSF, las preparaciones de la enzima BADH se pasaron rápidamente dos veces a través de columnas de filtración en gel (Sephadex G-25) con volumen de cama de 2 mL, según el método descrito por Penefsky (Penefsky, 1977) para eliminar el reductor 2-mercaptoetanol. El amortiguador de la filtración en gel fue el mismo que posee la enzima almacenada pero sin reductor: 50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 1 mM EDTA, 180 mM KCl y 10% (v:v) glicerol (amortiguador C). Todas las soluciones empleadas fueron desgasificadas sometiéndolas al vacío durante al menos 8 horas y saturadas con gas nitrógeno justo antes de su uso, todo esto con la finalidad de prevenir la oxidación de las cisteínas de la enzima por el oxígeno del aire. La solución madre de DSF siempre se preparó a la concentración de 2.5 mM en etanol absoluto (15 mg/ 2 mL etanol) y los ligandos de la enzima se disolvieron en agua desionizada saturada con nitrógeno.

La BADH se incubó con diferentes concentraciones de DSF en ausencia y presencia de ligandos en el amortiguador de la filtración en gel. Los ligandos y el DSF se adicionaron simultáneamente a la preparación enzimática. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de la preparación y se determinó su actividad enzimática como se describió previamente. Los datos cinéticos se analizaron por regresión no lineal mediante un programa de cómputo comercial.

Concentraciones de disulfiram empleadas: 50, 100, 150 y 200 μ M.

Ligandos empleados: betaina aldehído 0.2 mM, NADH 0.2 mM, NAD⁺ 0.2 mM y NADH 0.2 mM + BA 0.2 mM.

VI.3.6 Estudios de reactivación de la BADH modificada por DSF

Después de que la enzima se incubó con DSF durante aproximadamente 120 min y sufrió inactivación, la preparación enzimática se trató con un reductor fisiológico y otro no fisiológico, ditioneítrito (DTT, 5 mM) y glutatión reducido (GSH, 10 mM), respectivamente. Se siguió el curso temporal de la recuperación de la actividad de la enzima.

VI.3.7 Análisis de los datos

El ajuste de los datos experimentales de la actividad residual a los diferentes tiempos de incubación, para cada una de las fases, se realizó usando una ecuación de decaimiento exponencial doble que describe una cinética de primer orden:

$$(A_t / A_0) = (A_1 / A_0) e^{-k_1 t} + (A_2 / A_0) e^{-k_2 t} \quad \text{Ecuación 1}$$

en donde A_t y A_0 son los valores de actividad de la enzima al tiempo t y al tiempo cero, respectivamente, A_1 y A_2 son las amplitudes de las dos fases de inactivación, y k_1 y k_2 (k_{obs1} y k_{obs2}) son las constantes de velocidad del proceso de inactivación de pseudo-primer orden de las dos fases de inactivación.

Las constantes de velocidad de inactivación de segundo orden, k_{inact} , se estimaron de las pendientes de las líneas que resultan de los valores de k_1 y k_2 respecto a la concentración de DSF, de acuerdo a la expresión:

$$k_{obs} = k_{inact} [\text{DSF}] \quad \text{Ecuación 2}$$

Los valores de orden de reacción, n , se estimaron usando la ecuación:

$$\ln k_{obs} = \ln k_{inact} + n \ln [DSF] \quad \text{Ecuación 3}$$

los valores de n nos indican el orden de la reacción con respecto al DSF.

VI.3.8 Caracterización estructural de la enzima BADH modificada

El estudio de las propiedades estructurales de la enzima modificada químicamente consistió en: 1) detectar los posibles cambios en el estado de agregación, 2) la movilidad electroforética en PAGE y, 3) la fluorescencia intrínseca de la proteína. Para hacer estos ensayos, la enzima fue desalada previamente a través de una columna de Sephadex G-25 para eliminar al reductor, como se indicó anteriormente, y se incubó con DSF 50 y 200 μM , según el caso, hasta que se alcanzó un porcentaje de inactivación del 100%. Posteriormente, se sometió a un lavado en Centricon 30 000 (Milipore) con el amortiguador C, con la finalidad de eliminar el DSF que no reaccionó y evitar interferencias de éste en los estudios de la estructura nativa.

VI.3.8.1 Cromatografía de exclusión molecular

El estado de agregación de la enzima se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular. Las muestras de enzima BADH sin modificar (0.4 mg/mL) y modificada (0.2 mg/mL) se pasaron a través de una columna de exclusión molecular Superdex 200 (Pharmacia) acoplada a un sistema HPLC (Waters). Para la enzima control, la columna se equilibró con el amortiguador de almacenamiento y para la enzima modificada por DSF 50 μM se empleó el amortiguador C de desalado. Las condiciones fueron las mismas para ambas muestras: el volumen de muestra aplicado a la columna fue de 200 μL , la velocidad

de flujo del amortiguador de elución de 0.5 mL/min a 90 psi de presión, el tiempo de corrida 60 min. Se registraron los perfiles de elución midiendo la absorbancia a 280 nm de las fracciones obtenidas. Posteriormente se compararon los perfiles de elución de la BADH no modificada y modificada con DSF.

VI.3.8.2 Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida

La electroforesis nativa en geles de poliacrilamida (PAGE nativa) es una de las técnicas más útiles para estudiar la composición y la estructura de proteínas nativas, puesto que tanto la conformación como la actividad biológica permanecen intactos durante esta técnica. Los geles de gradiente de poro para electroforesis PAGE nativa perfilan las bandas de proteína y permiten que mezclas de proteínas se puedan separar en un único gel. Las proteínas se separan en el gel separador principalmente de acuerdo a su tamaño y forma, ya que cada proteína se mueve hasta la región del gel en la que el tamaño de poro no le permite avanzar. Después del tratamiento de la muestra con DSF como se indicó anteriormente, la enzima modificada y los respectivos controles se sometieron a una electroforesis PAGE nativa mediante dos métodos:

MÉTODO 1. Para correr el gel se empleó un equipo Phast System (Sistema Rápido) de Pharmacia y se corrió con el método 1 preestablecido en el equipo; el tiempo de corrida fue de 60 minutos.

Se usaron geles de gradiente de 5-15% poliacrilamida (Phast Gel Gradiente de 4-15, PHARMACIA) bajo las siguientes condiciones:

- Gel rápido de gradiente 4-15: las dimensiones son de 13 mm de la zona del gel apilador (4.5% acrilamida, 3% bisacrilamida), 32 mm de gradiente continuo de 5-

15% de acrilamida y de 1-2% de bisacrilamida; el espesor del gel es de aproximadamente 0.45 mm.

- Amortiguador del gel: Acetato 0.112 M, Tris 0.112 M, pH 6.4
- Amortiguador de corrida: el gel se corre con tiras de amortiguador para Phast Gel nativo, los cuales contienen L-alanina 0.88 M, Tris 0.25 M, pH 8.8. Las tiras de amortiguador están hechas de agarosa al 3% (p/v).

Principio del método. Al comienzo de la corrida, los iones de las tiras de amortiguador migran hacia el gel. Los iones acetato/L-alanina corren a través del gel dejando atrás una región de voltaje uniforme y pH constante (8.8). Cuando estos iones pasan el punto de aplicación de la muestra (después de 10 Vh) las proteínas son aplicadas al gel y concentradas entre los iones acetato y los de L-alanina antes de entrar al gel de separación. El pH en el gel separador es de 8.8, así que la mayoría de las proteínas tienen una carga neta negativa. Cuando las proteínas alcanzan el gel de gradiente, su movilidad se reduce paulatinamente debido a la disminución en el tamaño del poro.

MÉTODO 2. Se siguió el método convencional de Laemmli (1970) descrito en el apartado VI. 2.3 de esta sección, pero éste fue modificado para electroforesis nativa de manera que el gel separador, el gel apilador y las soluciones amortiguadoras de la muestra y de electrodos no contenían SDS y las muestras no fueron sometidas a un tratamiento térmico previo a la electroforesis para su desnaturalización. La zona de concentración del gel fue de 4% (p/p) de acrilamida (pH 6.8) y la zona de separación de las proteínas tenía 7.5% (p/p) de acrilamida (pH 8.8). En este caso las proteínas se separan de acuerdo a su carga, masa y forma. El revelado de las bandas de proteína se llevó a cabo por tinción con plata (Wray *et al.*, 1981) para ambos métodos.

VI.3.8.3 SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras

La enzima modificada con DSF se sometió a una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de acuerdo a Laemmli (1970), como se describe en el apartado VI.2.3 pero bajo condiciones no reductoras. lo cual se consiguió al modificar la composición de los amortiguadores de muestra:

- a) Amortiguador para la muestra sin β -mercaptoetanol 2X: Tris 0.125 M, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v)
- b) Amortiguador para la muestra con N-etilmaleimida 2X: Tris 0.125 M, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), N, N-etilmaleimida (NEM) 9 mM.

VI.3.8.4 Fluorescencia intrínseca

Las posibles alteraciones en la estructura terciaria de la proteína provocadas por el tratamiento con DSF se estudiaron mediante la técnica de fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófanos de la enzima. La medición se llevó a cabo a 30° C en un espectrofluorofotómetro Shimadzu 5000U. Para ello, las muestras de enzima pura, tanto el control como la inactivada por el tratamiento con DSF (0.1 μ g proteína/ μ L, en todos los casos), se excitaron a 296 nm en una celda de 400 μ L y la emisión de las muestras se registró a 340 nm. El amortiguador de las muestras fue: el amortiguador de almacenamiento en el caso de la enzima sin modificar y, para la enzima modificada por DSF, el amortiguador C. Finalmente, se compararon los espectros de fluorescencia de las dos muestras.

VII. RESULTADOS

VII.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LA BADH

Para la purificación se usaron hojas de amaranto que se habían sometido a déficit hídrico previamente a la extracción, con la finalidad de incrementar el contenido y, por ende, la actividad de la enzima BADH. Para evaluar su pureza, la preparación enzimática resultante del proceso de purificación, se sometió a una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida, en la que se observó una única banda de 63 kDa cuando se reveló por plata (Fig 15). Por tanto, la enzima usada en los estudios que se describen a continuación está totalmente pura.

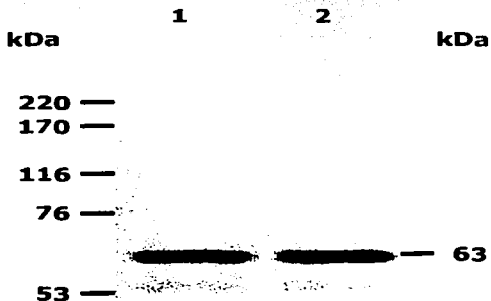


Figura 15. SDS-PAGE de la BADH de hoja de amaranto. Proteínas utilizadas como estándares M_r (kDa): miosina (220), α 2-macroglobulina (170), β -galactosidasa (116), transferrina (76) y glutámico deshidrogenasa (53). Carriles 1 y 2, enzima BADH purificada (2.5 μ g en cada carril). Las bandas de proteína fueron teñidas con plata.

VII.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE LA BADH POR DISULFIRAM

VII.2.1 Efecto del DSF sobre la BADH de amaranto en condiciones aerobias y presencia de un reductor

La enzima se almacena en un amortiguador que contiene el reductor β -mercaptoetanol en concentración 10 mM, y se requería conocer si el DSF actuaba sobre la enzima en presencia de este reductor, ya que en nuestro laboratorio se había encontrado que la BADH es inactivada por la especie reactiva peróxido de hidrógeno usando como medio de incubación el amortiguador de almacenamiento que contiene β -mercaptoetanol. Por lo tanto, inicialmente se realizaron pruebas para conocer el efecto del disulfiram en condiciones reductoras (Fig. 16). La concentración de DSF empleada se fijó con base en una revisión de estudios previos donde utilizan este compuesto para inactivar diversas enzimas (Lipsky *et al.*, 2001; Veverka *et al.*, 1997; Jan-Peter *et al.*, 1996; Mays *et al.*, 1995).

En la Figura 16 se muestra el resultado de un experimento típico de esta prueba en el cual no se observa claramente un proceso de inactivación; existe tan sólo una ligera tendencia de disminución de la actividad a través del tiempo. Es notoria la gran desviación que presentan los datos, lo cual puede deberse a la presencia del reductor, ya que en estas condiciones, la enzima inactivada puede recuperar su actividad y además el β -mercaptoetanol dada su naturaleza química, puede estar reaccionando con el disulfiram en vez del residuo catalítico, por lo que no se observa el verdadero efecto del inhibidor sobre la enzima. Todo ello explica las fluctuaciones de actividad observadas, las cuales claramente indican que es

necesario eliminar al β -SHOH previamente al tratamiento con DSF. Debido a esto, decidimos llevar a cabo los experimentos de inactivación en ausencia del reductor, lo que exige condiciones anaerobias para evitar la oxidación del residuo de cisteína esencial.

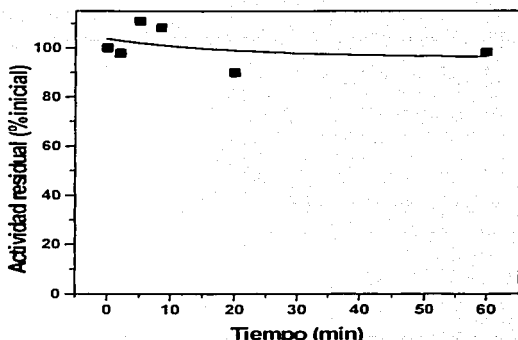


Figura 16. Prueba del efecto del DSF sobre la BADH de amaranto. La BADH purificada (1.3 μ M como dímero) se preincubó con DSF 50 μ M (■) en el amortiguador Hepes-KOH 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, KCl 180 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, glicerol 10% (v/v). Se siguió la actividad enzimática a través del tiempo.

VII.2.2 Efecto del DSF sobre la BADH en condiciones anaerobias y en ausencia de un reductor

Para caracterizar el efecto real que ejerce el disulfiram sobre la enzima se eliminó el agente reductor mediante un paso de filtración en gel en una columna de Sephadex G-25

equilibrada con el amortiguador de almacenamiento sin reductor (amortiguador C), como se describe en Materiales y Métodos. Para estos experimentos se usó una preparación de enzima BADH purificada, desgasada para eliminar el oxígeno disuelto y posteriormente saturada con gas nitrógeno. En la Figura 17 se muestra un experimento típico de esta prueba. Se aprecia que la enzima incubada con DSF efectivamente pierde actividad con respecto al control, lo que nos habla de que está ocurriendo un proceso de inactivación. Sin embargo, existe todavía una alta dispersión de los datos que no permite caracterizar confiablemente en términos cinéticos este proceso. Estos resultados nos sugirieron que el reductor no había sido eliminado totalmente del medio de reacción y que se requerían al menos dos pasos de filtración en gel.

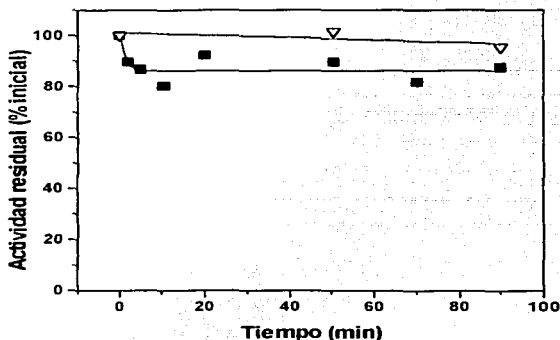


Figura 17. Efecto del DSF sobre la actividad de la BADH de una preparación enzimática desalada sólo una vez en el amortiguador C. La enzima ($1.3 \mu\text{M}$ como dímero) se preincubó con DSF $50 \mu\text{M}$ (■). Se siguió la actividad enzimática a través del tiempo. En triángulos abiertos se muestran los valores de la muestra control.

A partir de este ensayo, la enzima BADH se desaló mediante dos columnas de filtración en gel (Sephadex G-25), de 2 mL, equilibradas con el amortiguador C, la enzima se desgasificó al vacío tras lo cual se saturó con gas nitrógeno. Después de este tratamiento, la enzima se incubó con DSF de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Todos los experimentos que se describen a continuación se hicieron de esta forma.

VII.3. CINÉTICA DEL PROCESO DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA BADH POR DSF

VII.3.1 Dependencia del tiempo de incubación y de la concentración de DSF

La incubación de la enzima BADH con DSF a diferentes concentraciones en un intervalo de 50 a 200 μM , bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, produjo su inactivación. Ésta ocurrió en una manera dependiente del tiempo y de la concentración de DSF y siguió una cinética bifásica (Fig. 18).

El ajuste de los datos experimentales de la actividad residual a los diferentes tiempos de incubación, para cada una de las fases, se realizó usando la ecuación 1 de decaimiento exponencial doble.

Las constantes de velocidad de inactivación de pseudo-primero orden fueron linealmente dependientes a la concentración de DSF (Fig. 19A), lo que permitió estimar los valores de las constantes de velocidad de inactivación de segundo orden, k_{inact} , a partir de las pendientes de las líneas en la Figura 19A, y los valores obtenidos fueron: 11.67 ± 0.05 y $0.50 \pm 0.04 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, para las fases de inactivación rápida y lenta, respectivamente. En dicho gráfico las líneas del ajuste pasan por el origen lo que indica que la inactivación se lleva a

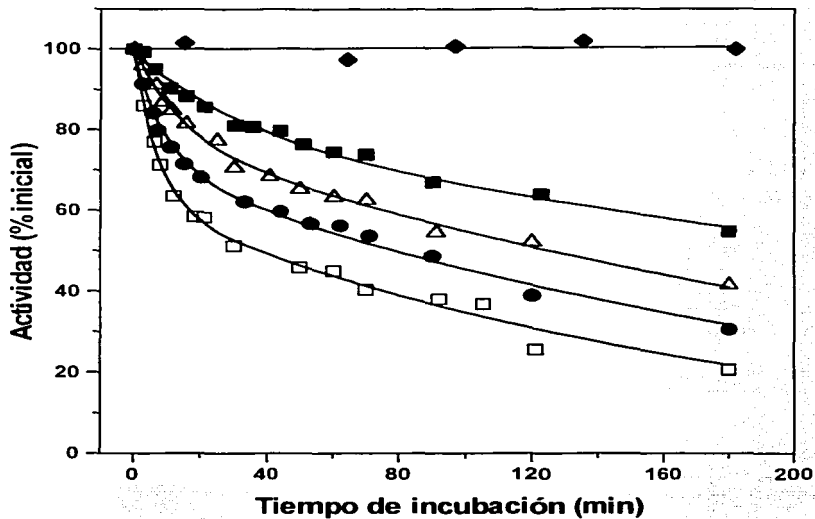


Figura 18. Inactivación de la BADH dependiente de la concentración de DFS. La enzima ($1.3 \mu\text{M}$ como dímero) se incubó en presencia de DSF $50 \mu\text{M}$ (■), $100 \mu\text{M}$ (Δ), $150 \mu\text{M}$ (●) y $200 \mu\text{M}$ (□), bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas para medir la actividad enzimática residual. Las líneas son teóricas resultado del mejor ajuste a la ecuación 1 obtenido por regresión no lineal de la media de datos correspondientes a 5 experimentos independientes.

cabo en un sólo paso (a) y que no hay formación aparente de un intermediario E*DSF (b) antes de que se modifique irreversiblemente la enzima, para el intervalo de concentración de DSF probado, como se muestra en el siguiente esquema:



El orden de reacción, n , se estimó usando la ecuación 3 y fue de 1.09 ± 0.08 para la fase rápida y 0.77 ± 0.04 para la fase lenta de inactivación (Fig. 19B). Estos valores indican que la pérdida de actividad catalítica es de primer orden con respecto a la concentración de DSF.

En el proceso de inactivación la amplitud de las fases rápida y lenta, 25% y 75%, respectivamente, fueron las mismas a cualquier concentración de DSF probada, lo que sugiere que la inactivación bifásica se debe probablemente a la existencia de dos conformeros de la BADH con diferente reactividad o accesibilidad de sus tiolatos catalíticos. Puesto que la proporción de ambas formas estaría dada por la amplitud de las fases, bajo nuestras condiciones experimentales la forma más reactiva sería un 25% y la menos reactiva un 75% del total de la proteína BADH. Es interesante que la misma cinética bifásica de inactivación se obtuvo cuando se trató a la enzima con otros reactivos específicos de grupos tioles, tal es el caso de la iodoacetamida (Muñoz-Clares *et al.*, 2003). Es importante aclarar que el intervalo de concentración de DSF empleado en estos experimentos estuvo limitado a la solubilidad máxima de este compuesto en etanol absoluto, así que la máxima concentración que se puede usar es 200 μM .

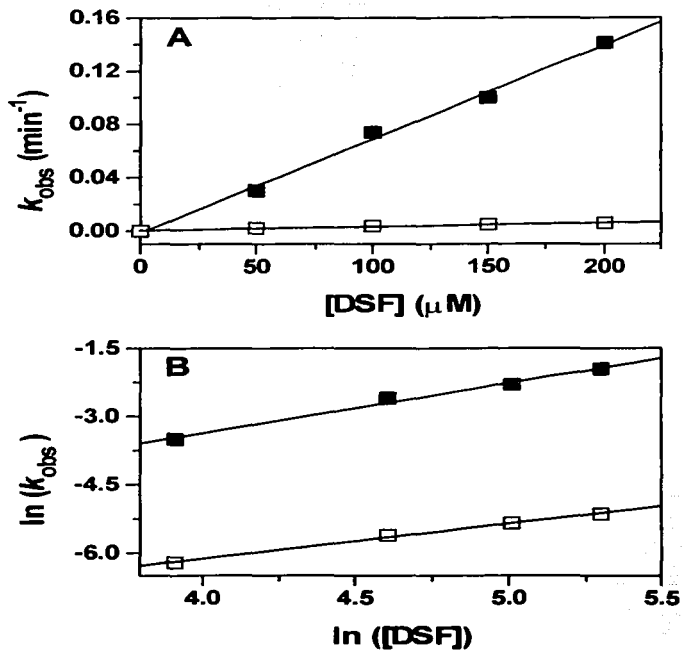


Figura 19. (A) Dependencia de las constantes de velocidad de inactivación de la concentración de DSF y determinación de la constante de velocidad de segundo orden. (B) Determinación del orden de reacción respecto al DSF a partir de los datos en (A). Los símbolos (■) y (□) corresponden a los valores de k_{obs} de la primera y segunda fase, respectivamente, estimadas a partir de los datos mostrados en la Fig. 18.

VII.3.2 Efecto del pH sobre la cinética de inactivación por DSF

A pH 8.8 la cisteína catalítica es más reactiva por lo que la inactivación fue más rápida, pero la cinética de inactivación por DSF siguió siendo bifásica (Fig. 20). Las constantes de inactivación de segundo orden fueron $1.53 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y $2.99 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para las fases rápida y lenta, respectivamente. Estos valores son alrededor de tres órdenes de magnitud mayores que los estimados a pH 7.5, como se esperaba ya que una mayor proporción de la cisteína catalítica existe como tiolato. Es también posible que la accesibilidad del tiolato catalítico al disolvente sea mayor a pH 8.8 que a 7.5. Cabe resaltar que las amplitudes de las fases rápida y lenta, 22 y 78%, respectivamente, fueron similares a las obtenidas a pH 7.5, lo que indicaría que el pH no afecta la concentración relativa de las dos formas de la enzima que proponemos existen.

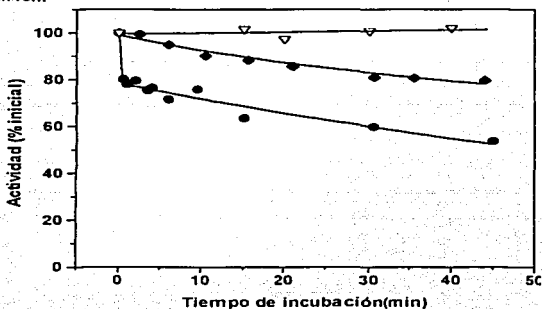


Figura 20. Efecto del pH sobre la cinética de modificación. La enzima ($1.3 \mu\text{M}$ como dimero) se incubó en ausencia (∇) o presencia de DSF $50 \mu\text{M}$ a pH 7.5 (\blacklozenge) o pH 8.8 (\bullet), bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Se siguió el curso temporal de la pérdida de actividad enzimática.

VII.4. EFECTO DE LOS LIGANDOS EN LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN DE LA ENZIMA BADH POR DSF

Se realizaron estudios preliminares con diferentes ligandos de la enzima para conocer si la presencia de éstos tenía algún efecto en su inactivación por DSF. Estas pruebas se hicieron en las mismas condiciones (no reductoras) a 30 °C, utilizando DSF 50 µM y los siguientes ligandos: sustrato BA 0.2 mM, coenzima sustrato NAD⁺ 0.5 mM y coenzima producto NADH 0.2 mM. Las alícuotas de DSF y del ligando se adicionaron simultáneamente a la solución de enzima.

Cada curva de inactivación de la BADH por DSF en presencia de los ligandos probados fue particular del ligando empleado (datos no mostrados). Ello nos llevó a pensar que la inactivación en cada caso se podría deber propiamente al ligando empleado y no al DSF. Para descartar esta posibilidad, se realizaron ensayos en los cuales la enzima, en ausencia de reductor y oxígeno y burbujeadada con nitrógeno, se incubó un tiempo determinado (90-120 min) con cada ligando previamente a la adición del DSF. Es decir, el DSF y el ligando ya no se adicionaron simultáneamente. Este ensayo de incubación previa de la enzima con NAD⁺, BA y NADH nos indicó que la inactivación de la BADH en presencia de ligandos definitivamente no se debe a éstos sino al DSF, ya que al ser incubada la enzima por más de 60 min con cada uno de los ligandos en ausencia de DSF, la actividad enzimática se conservó, observándose como máximo una disminución del 5% con respecto a la actividad inicial (datos no mostrados). Por lo tanto, dado el importante efecto que parecen tener los ligandos en el proceso de inactivación, se decidió caracterizar el efecto de cada ligando.

Se encontró que los ligandos del sitio activo, sorprendentemente, no sólo no protegen a la enzima de la inactivación, sino que promueven un incremento en ésta en el siguiente orden: $BA > NADH > BA + NADH > NAD^+$. Los ligandos no afectan significativamente la amplitud de las fases observadas en su ausencia pero si producen incrementos notables que llegan a ser hasta de ≈ 20 veces en las constantes de velocidad de inactivación de la primera fase e incrementos mucho menores en las constantes de velocidad de la segunda fase (Fig. 21 y Tabla 3). Estos resultados sugieren que los ligandos inducen un cambio conformacional en la enzima que aumenta la reactividad y/o accesibilidad de la cisteína catalítica.

Tabla 3. Efecto de los ligandos sobre la cinética de inactivación de la BADH por DSF 50 μ M.

LIGANDO (0.2 mM)	AMPLITUD ₁ (%)	k_{obs1} (min^{-1}) ($\times 10^{-3}$)	AMPLITUD ₂ (%)	k_{obs2} (min^{-1}) ($\times 10^{-3}$)
Ninguno	19.3 \pm 2.4	30.0 \pm 11.1	79.7 \pm 1.9	2.0 \pm 0.2
NAD ⁺	18.7 \pm 3.5	180.4 \pm 128.7	81.8 \pm 2.9	2.8 \pm 1.2
NADH	22.8 \pm 3.7	637.3 \pm 372.2	77.1 \pm 3.7	2.5 \pm 1.6
BA	15.4 \pm 8.9	156.8 \pm 56.4	85.3 \pm 8.3	8.5 \pm 2.6
BA + NADH	24.9 \pm 2.7	162.7 \pm 42.0	74.2 \pm 4.0	2.8 \pm 1.5

Los valores \pm S.E. se estimaron por ajuste de los datos de inactivación a una ecuación de decaimiento exponencial doble, usando regresión no lineal. BA, betaina aldehído.

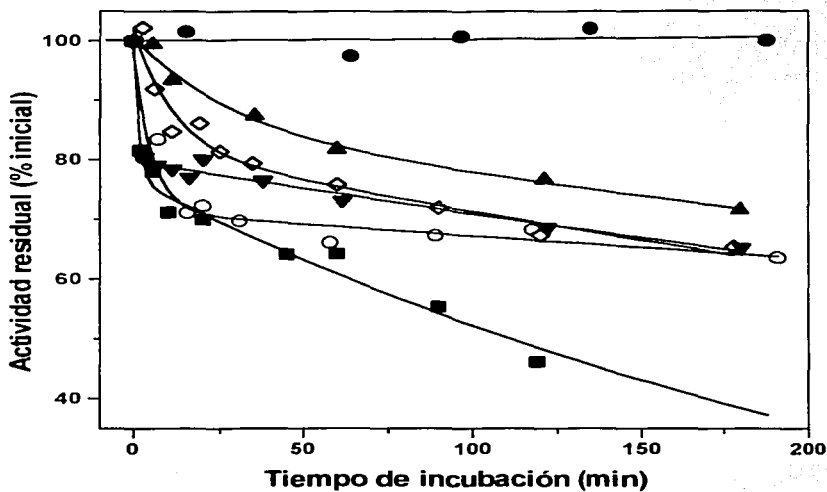


Figura 21. Efecto de los ligandos de la enzima en el proceso de inactivación de la BADH por DSF. La enzima ($1.3 \mu\text{M}$ como dímero) se incubó sin (●) o con DSF $50 \mu\text{M}$ en la ausencia (▲) o presencia de los siguientes ligandos: betaina aldehído 0.2 mM (■), NADH 0.2 mM (▼), NAD⁺ 0.2 mM (◇) y betaina aldehído 0.2 mM + NADH 0.2 mM (○), bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Se siguió el curso temporal del proceso de inactivación.

VII.5. REACTIVACIÓN DE LA ALDH INACTIVADA POR DSF POR AGENTES REDUCTORES

El tratamiento de la enzima inactivada por DSF, tanto en ausencia como en presencia de la betaina aldehído, con DTT 5 mM resultó en una recuperación de la actividad que alcanzó aproximadamente el 60% de la actividad inicial después de 120 min de incubación con el reductor (Figs. 22 y 23). La incubación con GSH 10 mM no pudo reactivar apreciablemente a la enzima (Figs. 22 y 23). Se usó esta concentración porque se sabe que el GSH reducido en la mayoría de las células eucarióticas se encuentra generalmente en el intervalo de 2-10 mM (Meister, 1983). Este mismo resultado se obtuvo con β -mercaptoetanol 10 mM (datos no mostrados), aunque la concentración de grupos tiol es la misma con 10 mM de estos monotiololes que con 5 mM de DTT (un ditiol). Se tienen reportes de un comportamiento similar del GSH en ensayos de reactivación de otras ALDH inactivadas por DSF (Vallari y Pietruszko, 1982). La razón para este fracaso no está aún clara pero puede deberse a que la capacidad de los monotiololes para reducir puentes disulfuro es muy inferior a la de los ditiololes, ya que éstos forman puentes disulfuro intramoleculares muy estables que desplazan la reacción hacia la oxidación del ditiol.

La reactivación que se alcanza depende del grado de inactivación del que se parte siendo mayor cuanto menos tiempo se deja inactivando a la enzima (Fig. 24). Este hallazgo indica que la enzima inactivada por DSF sufre gradualmente cambios estructurales irreversibles, lo que así mismo explicaría por qué no se recupera la actividad enzimática en un 100%.

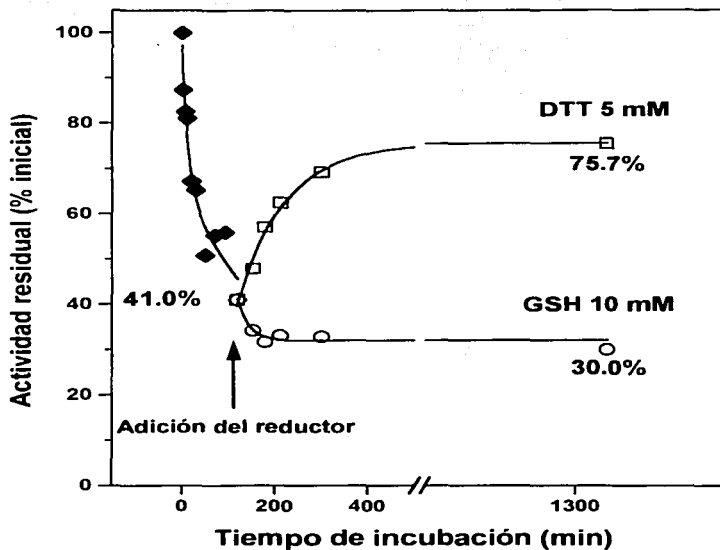


Figura 22. Reactivación de la BADH inactivada por DSF. La enzima ($1.3 \mu\text{M}$ como dímero) se incubó con DSF $50 \mu\text{M}$ como se indica en Materiales y Métodos. Para revertir el efecto del DSF, después de 180 min de incubación con este reactivo, a una parte de la mezcla de reacción se le agregó DTT 5 mM y a otra GSH 10 mM . A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH.

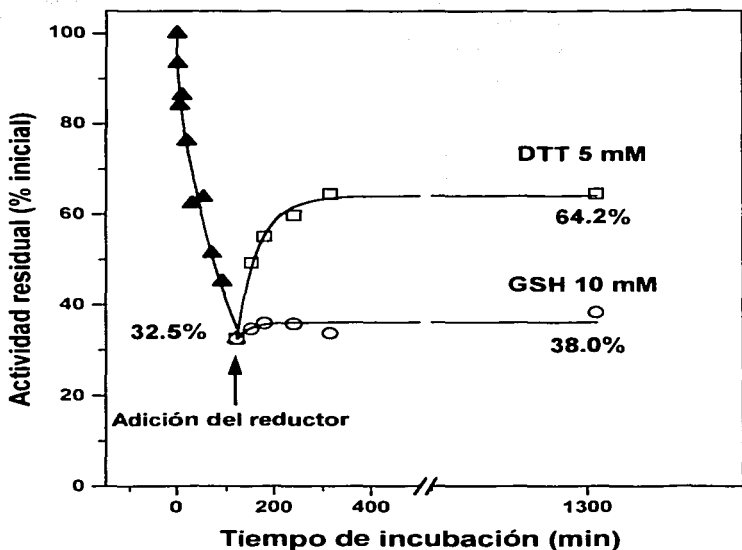


Figura 23. Inactivación de la BADH por DSF en presencia de BA y reactivación por DTT y GSH. La enzima (1.3 μ M como dímero) se incubó con DSF 50 μ M como se indica en Materiales y Métodos. Para revertir el efecto del DSF, después de 180 min de incubación con este reactivo, a una parte de la mezcla de reacción se le agregó DTT 5 mM y a otra GSH 10 mM. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para determinar la actividad residual de la BADH.

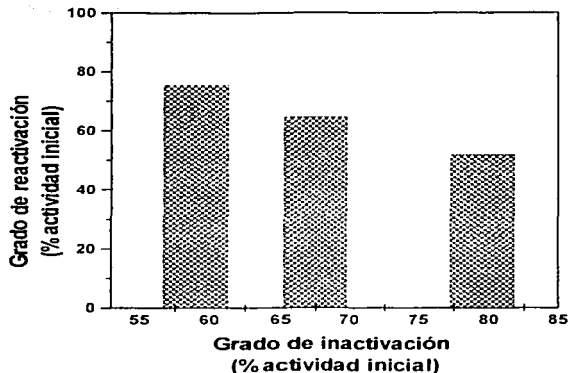


Figura 24. Reactivación de la BADH inactivada por DSF dependientes del grado de inactivación. El tiempo de incubación de la enzima inactivada por DSF con los agentes reductores fue de 18 h.

VII.6. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA ENZIMA BADH MODIFICADA.

Para conocer los cambios que el DSF producía en la estructura de la enzima BADH al inactivarla, se hicieron estudios de la enzima inactivada al 100% tras una incubación con DSF 50 μ M y 200 μ M durante 12 h, como se describe en Materiales y Métodos. La estructura cuaternaria de la enzima se estudió por medio de una cromatografía de exclusión molecular y mediante electroforesis de gel nativa y desnaturalizante. La estructura terciaria se estudio por la técnica de fluorescencia intrínseca de la proteína.

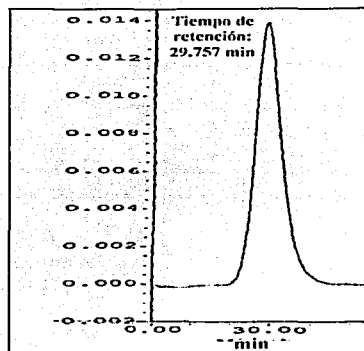
VII.6.1 Efecto del DSF en el estado de agregación de la enzima

Cromatografía de exclusión molecular. Se evaluaron los posibles cambios en el estado de agregación de la enzima modificada químicamente por el DSF mediante una cromatografía de exclusión molecular. Se compararon los perfiles de elución de la enzima previamente tratada con DSF 50 μM por 12 h y de una enzima control que no había sido tratada con dicho agente. Como se puede observar en la Figura 25, se encontró que no existen diferencias significativas entre los tiempos de elución de ambas muestras, 29.757 min y 29.804 min para la enzima sin modificar y la inactivada, respectivamente. Ambos tiempos corresponden a la estructura dimérica de la enzima nativa. Por tanto, el DSF no altera el estado de oligomerización de la enzima, es decir, no produce la disociación del dímero ni forma agregados de mayor masa molecular.

Electroforesis nativa en gel de poliacrilamida. Se decidió corroborar el resultado obtenido mediante la técnica de exclusión molecular usando la electroforesis en gel de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes. Como controles, se usaron las BADHs activas (no tratadas con DSF) obtenidas tanto en presencia como en ausencia del reductor y la BADH de riñón de cerdo, que es un homotetrámero cuyas subunidades tienen una masa molecular muy semejante a las de la BADH de hoja de amaranto.

Se observó que, aparentemente, las bandas de proteína en la Figura 26 tenían una concentración de proteína diferente entre sí, sin embargo, se cargó el mismo volumen a una concentración estándar (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) para todas las muestras. Esto pudo deberse a que el método de carga del equipo Phast System de Pharmacia no permite saber con exactitud el volumen de muestra aplicado pues funciona por capilaridad y con volúmenes de alrededor

(A)



(B)

ABS 280 nm

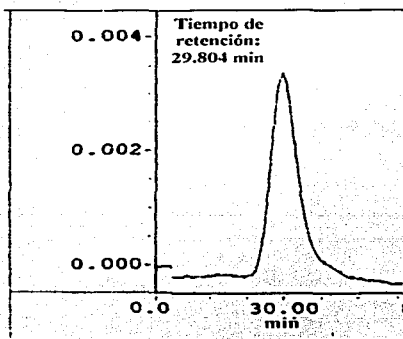


FIG. 25. Cromatografía de exclusión molecular de la BADII. (A) Perfil de elución de la enzima ($0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) no tratada con DSE. **(B)** Perfil de elución de la enzima ($0.07 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) inactivada por DSE $50 \mu\text{M}$. Abs 280 nm . absorbancia a 280 nm.

de 1 μ L. Así mismo, se encontró que, al pH de corrida del equipo con el que se realizó la electroforesis PAGE en condiciones nativas, la BADH de hoja de amaranto es inestable y se disocia, por lo cual no pudimos obtener resultados confiables (Fig. 26). Sin embargo, cabe mencionar que: 1) no se encontraron bandas correspondientes a formas con un estado de agregación superior al dímero; 2) la enzima tratada con DSF se disocia en igual o mayor grado que la no tratada y 3) se encontraron diferencias entre las enzimas control y modificada por DSF, pero a nivel de monómero, no de dímero. Se observaron dos bandas de proteína con una masa molecular correspondiente a la subunidad. Los resultados indican que no se forman puentes disulfuro intersubunidad que produzcan un dímero entrecruzado covalentemente o un agregado mayor (tetrámero), pero que pueden formarse puentes disulfuro intra-subunidad produciendo monómeros con una movilidad electroforética alterada. Por ello, se decidió hacer estudios de electroforesis en condiciones desnaturizantes para confirmar la formación de estos puentes disulfuro intra-subunidad.

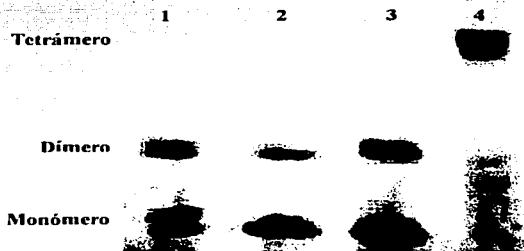


Figura 26. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (Phast System) de la BADH tratada con DSF. Carril 1, enzima 100% inactivada con DSF 200 μ M. Carril 2, enzima pura activa en ausencia de reductor. Carril 3, enzima pura activa en presencia de reductor. Carril 4, BADH de riñón de cerdo activa. Las muestras se trataron como se indicó en Materiales y Métodos y se aplicaron 0.2 μ g de proteína en cada carril.

Antes de ello, se repitió la electroforesis nativa en geles de poliacrilamida (PAGE nativa) usando la técnica descrita por Laemli (1970) adaptada para condiciones nativas, es decir, en ausencia de SDS, ya que el pH de corrida es en este caso inferior, pH 8.3, y la enzima es estable a este valor de pH. Se encontró que bajo estas condiciones la enzima no se disocia. Se corroboró que la enzima no se afecta por DSF, al menos en lo que respecta al estado de oligomerización, pues la movilidad electroforética de la enzima modificada y sin modificar fue la misma (Fig. 27).

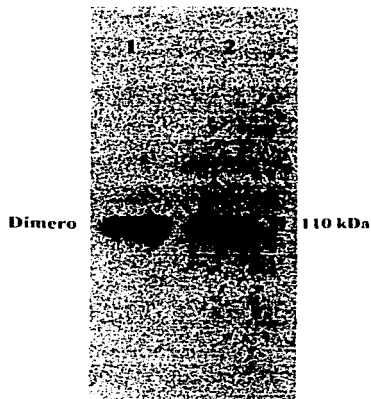


Figura 27. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas de la BADH tratada con DSF. Carril 1, enzima pura activa en presencia de reductor. Carril 2, enzima 100% inactivada con DSF 50 μ M. Las muestras se trataron como se describió en Materiales y Métodos. La concentración de enzima fue de 0.2 μ g/ μ L y se aplicaron 2 μ g de proteína a cada carril.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida. En la Figura 28 se observa que la enzima tratada con DSF y la 100% inactivada presentan dos bandas en SDS-PAGE: una que corresponde a una masa molecular aparente de 63 kDa y otra adicional, muy débil correspondiente a una masa molecular aparente de 55 kDa. En este experimento, el

amortiguador de carga contenía β -mercaptoetanol, y dado que este agente no es capaz de reactivar la enzima una vez inactivada, no se tuvo la precaución de eliminarlo de la

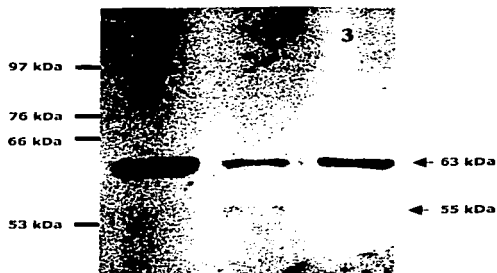


Figura 28. Electroforesis SDS-PAGE de la enzima BADH modificada por DSF. Carril 1, enzima ($0.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) pura mantenida con β -mercaptoetanol. Carril 2, enzima ($0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) inactivada al 100% por DSF $200 \mu\text{M}$. Carril 3, enzima ($0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) pura mantenida activa en ausencia de β -mercaptoetanol. Para la electroforesis las muestras se trataron como se describe en Materiales y Métodos. A la izquierda se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

solución amortiguadora empleada. Sin embargo, el reductor pudo actuar sobre la enzima modificada independientemente del hecho de que no fuese capaz de hacer que la enzima recuperara su actividad. Por lo tanto, se hicieron otros experimentos en los cuales el amortiguador de carga no contenía β -mercaptoetanol (Fig. 29).

Esta vez se encontró que la enzima control no presentaba sólo una banda sino tres, la banda de mayor intensidad, correspondiente a la enzima reducida, de alrededor de 63 kDa y otras dos de aparente menor masa molecular (55 y 50 kDa) que pudiesen ser resultado de la

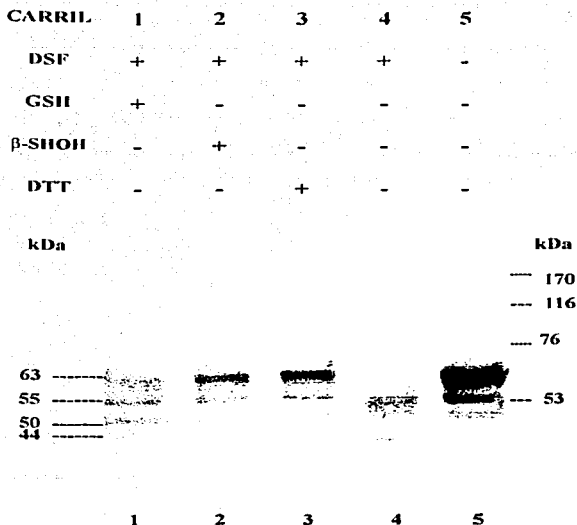


Figura 29. Efecto sobre la movilidad electroforética de la BADH modificada por DSF.

Carriles 1, 2, 3 y 4, la enzima (0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) pura se inactivó 100% por DSF 200 μM por 12 h, y posteriormente se incubó durante 4 h con los reductores GSH 10 mM, β -mercaptoetanol 10 mM o DTT 5 mM según se indica. Carril 5, enzima (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) pura no tratada con DSF. A la derecha se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

formación de puentes disulfuro intramoleculares, debido a que las muestras se desnaturalizaron por calor en ausencia del reductor y a que la enzima de acuerdo a su secuencia aminoacídica tiene un alto número de residuos de cisteína (16 por subunidad). El hallazgo más notable en el caso de la enzima inactivada por DSF (Fig: 29, Carril 4) es que ya no presenta la banda de 63 kDa correspondiente a la enzima reducida y la banda de mayor intensidad que se observa corresponde a la enzima oxidada de 55 kDa. También se observan otras dos bandas tenues de menor masa molecular (50 y 43 kDa), las cuales, al igual que en la enzima control, se cree que son productos de oxidación formados a consecuencia del tratamiento de la muestra para la electroforesis. En los carriles previos se tienen muestras de enzima que fueron inactivadas totalmente y después tratadas con agentes reductores: GSH, β -mercaptoetanol y DTT. Sus patrones electroforéticos son muy similares a la enzima control, lo que sugiere que la incubación con los compuestos reductores convierte a la enzima inactivada a su forma reducida aunque no necesariamente activa (se realizaron mediciones de actividad que no se muestran), siendo mayor este efecto al emplear DTT y apenas perceptible al usar GSH.

Finalmente, con la finalidad de bloquear los residuos de cisteína libres de la enzima, y evitar así la formación de puentes disulfuro durante la preparación de la muestra para la electroforesis, se decidió utilizar N-etilmaleimida en la solución amortiguadora de carga. La NEM es un reactivo específico de grupos tioles, que reacciona con éstos en forma irreversible. Satisfactoriamente, se observó que con este tratamiento las formas de la enzima que se aprecian son la de 63 kDa en el caso de la enzima no tratada y, en las muestras tratadas e inactivadas con DSF, una única banda de 55 kDa a una concentración de DSF de 200 μ M y, en el caso de 50 μ M, además de esta banda se observa una banda de

63 kDa correspondiente a un monómero que no posee ningún disulfuro. Entonces, al parecer, la proporción de la forma de la enzima con un puente disulfuro intrasubunidad depende de la concentración de DSF que se emplee y del tiempo de incubación con el agente modificador, aunque es independiente de la pérdida total de actividad. A una concentración de 200 μ M, la enzima está totalmente en la forma aparente de 55 kDa (FIG: 30).

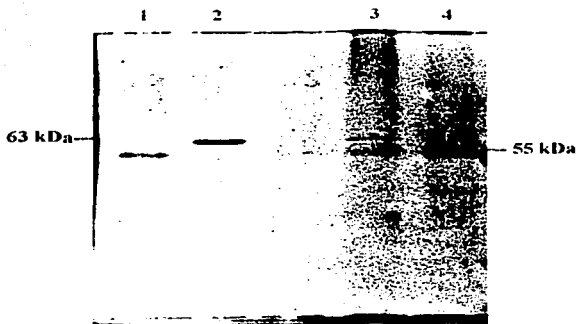


Figura 30. Efecto sobre la movilidad electroforética de la BADH modificada por DSF. Carriles 1 y 4, enzima (0.1 μ g/ μ L) tratada con DSF 200 μ M. Carril 2, enzima pura (0.2 μ g/ μ L). Carril 3, enzima (0.1 μ g/ μ L) inactivada por DSF 50 μ M. Las muestras se trataron como se describe en Materiales y Métodos.

Efecto del DSF en la fluorescencia intrínseca de la BADH de hoja de amaranto

La modificación de la estructura terciaria de la BADH se evaluó por medio de ensayos de fluorescencia intrínseca de la proteína, específicamente la debida a residuos de triptofano.

En la Figura 31 se presentan los espectros de fluorescencia de la BADH obtenidos antes y después de un tratamiento con DSF 50 μM por 12 h. Se aprecia claramente que en la enzima modificada por DSF hay un apagamiento total de la fluorescencia con respecto al control, así como un corrimiento del pico de máxima emisión hacia valores de longitud de onda inferiores. Estos resultados sugieren que en la región del sitio activo o en sus proximidades se encuentran un(os) residuo(s) de triptofano cuyo ambiente se modifica después del tratamiento de la enzima con DSF.

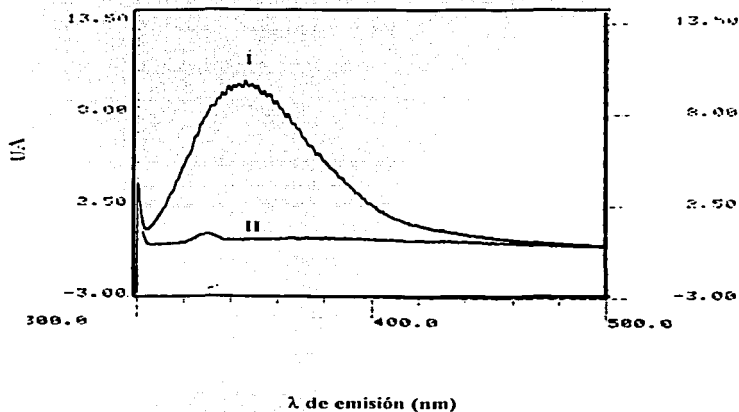


Figura 31. Espectro de fluorescencia intrínseca de la BADH. Bajo las condiciones descritas en Materiales y Métodos, la enzima se excitó a 296 nm y se registró su emisión a 340 nm, antes (I) (0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y después (II) (0.07 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de un tratamiento con DSF 50 μM . U.A.: unidades arbitrarias de intensidad de fluorescencia.

VIII. DISCUSIÓN

El DSF es un conocido inhibidor de las aldehído deshidrogenasas ampliamente usado en el tratamiento de alcoholismo. Debido a la importancia que tiene elucidar tanto su mecanismo de acción como su metabolismo en el humano, y de esta forma poder establecer si este fármaco es recomendable como parte de una terapia contra el alcoholismo, este compuesto ha sido objeto de muchos estudios. Tomando en cuenta que el DSF posee la característica de ser un reactivo específico de grupos tioles, nosotros lo hemos utilizado con un objetivo muy diferente: como una herramienta para la caracterización del sitio activo de la enzima BADH de amaranto para su comparación, en cuanto a reactividad y accesibilidad de la Cys esencial, con los sitios activos de las BADHs de origen bacteriano (*P. aeruginosa*) y animal (de riñón de cerdo). Por ello, una de las principales aportaciones de este trabajo es proponer que el DSF, al igual que otros reactivos muy usados como la iodoacetamida o la N,N-etilmaleimida, es útil en el estudio de los residuos de cisteína en las proteínas en general, aunque éstas no estén involucradas en el metabolismo del etanol, como es el caso de la BADH de amaranto.

VIII.1. INACTIVACIÓN DE LA BADH POR DSF

En el presente estudio se encontró que la enzima BADH de amaranto es inactivada efectivamente por el disulfiram. Cuando el DSF se adicionaba en ausencia o presencia de ligandos, se produjo una inactivación irreversible dependiente del tiempo y de la concentración, que seguía una cinética de pseudo-primer orden. De este resultado, lo que intriga, y que no se había reportado anteriormente con ninguna de las enzimas que se inactivan por DSF, es que la cinética de inactivación presenta dos fases claramente

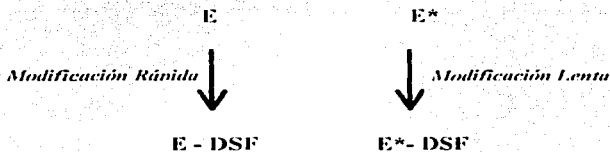
diferentes: la k_{obs} de la fase rápida es alrededor de 20 veces mayor que la correspondiente a la fase lenta. Suponiendo que la inactivación ocurre por modificación de la cisteína catalítica, la cinética bifásica puede deberse a:

1) *Cooperatividad negativa entre los sitios activos.* De ser este el caso, dado que la enzima es dimérica, la amplitud de las fases debería ser de 50% - 50%, no 25 y 75% como se ha encontrado. Esto es porque se requeriría la modificación de la cisteína esencial de un sitio activo para que se afectase la modificación de la cisteína esencial del otro sitio activo.

2) *Protección parcial de la cisteína catalítica al modificarse por DSF otra cisteína no esencial.* La BADH de hoja de amaranto posee 16 residuos de cisteína, de los cuales sólo uno es el conservado en las BADHs, y ALDHs en general, y es esencial para la actividad de la enzima. El modelo tridimensional de la BADH (Fig.32) que se obtuvo recientemente en nuestro laboratorio a partir de la secuencia de dicha proteína (Legaria *et al.*, 1998) muestra que solamente el residuo catalítico (Cys 294) y uno próximo a éste (Cys 453) (Fig. 35) están expuestos al medio, de acuerdo a un ensayo de simulación de *accessibilidad* de cisteínas mediante el programa de cómputo Swiss- Pdb viewer v. 3.6b3. Por lo que en principio no se puede descartar la posibilidad de que la modificación por DSF de la Cys 453 afecte a la velocidad de inactivación de la Cys 294. Sin embargo, los resultados obtenidos en presencia de los ligandos, que se discuten más adelante, sugieren que la cinética de inactivación bifásica no se debe a esta razón, ya que sería difícil explicar cómo los ligandos incrementan la velocidad de inactivación de la fase rápida sin afectar su amplitud. Para que esto ocurriese habría que suponer que se incrementan la reactividad y/o

accesibilidad de los dos residuos de cisteína, la esencial y la no esencial, por un mismo factor, lo que es difícil de admitir.

3) *Existencia de sitios activos heterogéneos por existir dos poblaciones de homodímeros o heterodímeros, cuyas cisteínas esenciales tengan diferente reactividad*, de acuerdo al siguiente modelo..



Esta posibilidad es la más consistente con nuestros resultados. La proporción de ambas formas estaría dada por la amplitud de las fases, por lo que bajo nuestras condiciones experimentales, la forma más reactiva sería, aproximadamente, 25% y la menos reactiva 75% del total de la proteína BADH. Puesto que la enzima aparece altamente homogénea en electroforesis SDS - PAGE, y dado que no hay todavía evidencias de que existan isoenzimas, estas dos formas enzimáticas pueden ser diferentes conforméromos de la BADH. Cabe recalcar que la misma cinética bifásica de inactivación se ha obtenido en nuestro laboratorio con otros reactivos específicos de grupos tioles, tal es el caso de la iodoacetamida (Mújica-Jiménez y Muñoz-Clares, resultados sin publicar). Las dos hipotéticas formas de la enzima podrían estar presentes *in vivo*, o ser el resultado de una modificación desconocida y casual durante el procedimiento de extracción y purificación.

El valor estimado de la constante de velocidad de inactivación de segundo orden a pH 8.8 para la fase rápida de inactivación, es de $1.53 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que es alrededor de dos veces

superior a la obtenida usando la enzima ALDH2, que es el blanco del DSF en la terapia contra el alcoholismo, y a las reportadas para otras ALDHs (Myhre *et al.*, 2001). Esta alta sensibilidad al DSF de la BADH de hoja de amaranto es interesante porque contrasta con el reporte de que la BADH de hígado humano es resistente a la modificación por este compuesto. Esta alta sensibilidad al DSF permite suponer que la enzima también será sensible a los herbicidas análogos a este compuesto.



Figura 32. Modelo tridimensional del monómero de la enzima BADH de amaranto a partir de la secuencia de aminoácidos y de las coordenadas cristalográficas de la única BADH que se conoce su estructura, la BADH de hígado de bacalao, con la que posee una identidad del 39.4 %.

En la Figura 33 se muestran las estructuras y dimensiones aproximadas de moléculas, incluyendo al DSF, que se han reportado que son particularmente buenas en unirse a o reaccionar con el sitio activo de la aldehído deshidrogenasa citosólica de hígado de oveja, la cual ocupa también NAD^+ como coenzima. Se trata de compuestos de naturaleza hidrofóbica y esencialmente planares y aunque el DSF no es estrictamente planar, puede adoptar tal conformación. Por lo tanto, se sugiere que cuando la estructura tridimensional de la BADH de amaranto sea elucidada, se revelará un surco hidrofóbico de unión bastante largo al cual el DSF se puede ajustar e interactuar fuertemente.

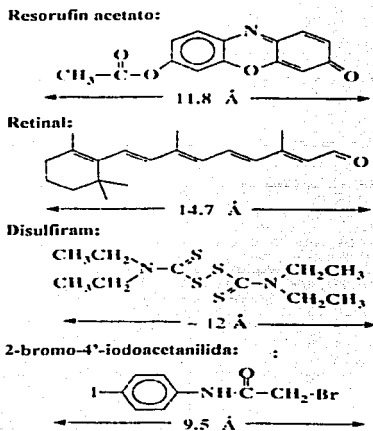


Figura 33. Comparación de las estructuras y dimensiones de ciertas moléculas que tienen alta afinidad para la ALDH citosólica de hígado de oveja (Kitson y Kitson, 1996).

VIII. 2. EFECTO DE LOS LIGANDOS EN LA INACTIVACIÓN DE LA BADH POR DSF

Todos los ligandos incrementan la velocidad de inactivación de la primera fase de la inactivación por DSF. Estos hallazgos contrastan con el reporte de que la ALDH clase 3 de hígado de rata sufre inactivación por DSF sólo en ausencia de NAD⁺ (Koivusalo y Rautoma, 1987). Protección parcial por este ligando se observa también en la inhibición por DSF de la enzima ALDH mitocondrial de baja K_m de hígado de rata (Marchner y Totmar, 1983).

Con respecto a la betaina aldehído, su efecto sobre la velocidad de inactivación intriga por dos razones: primero, porque indica que el sustrato se une a la enzima en ausencia de la coenzima a las concentraciones relativamente bajas de sustrato usadas en estos experimentos (0.2 mM), aunque se sabe que el mecanismo cinético de la BADH de amaranto es ordenado a bajas concentraciones de sustrato, uniéndose la coenzima en primer lugar (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1993). Por lo tanto, es probable que, bajo nuestras condiciones experimentales, la betaina aldehído se una a la enzima libre en forma no productiva, por lo que no estaría interactuando con la cisteína esencial para formar el tiohemiacetal intermediario de reacción. Segundo, aun si éste fuese el caso, la unión de la betaina aldehído al subsitio del sustrato debería proteger estéricamente a la cisteína catalítica de la modificación y, entonces, disminuir la velocidad de inactivación. Sin embargo, existe la posibilidad de que, en ausencia de la coenzima NAD⁺, la betaina aldehído se una no productivamente al subsitio de la coenzima y pueda así permitir la modificación química de uno o ambos residuos de cisteína del sitio activo. Cuando tanto la betaina aldehído como el NADH están presentes en el medio de incubación, la constante de

velocidad de la primera fase se incrementa con respecto a la encontrada para la enzima libre pero es mucho menor que en los complejos binarios de la enzima con NADH o betaina aldehído. Este resultado sugiere que si la coenzima está presente, la betaina aldehído se une al subsitio del aldehído, otorgando así alguna protección contra la inactivación. Cabe mencionar que posiblemente no se observaron los efectos máximos de protección del sustrato debido a las concentraciones de aldehído usadas en estos experimentos.

Las amplitudes de las fases rápida y lenta no se modificaron significativamente en las cinéticas de inactivación en presencia de los ligandos probados. Este hallazgo apoya la hipótesis de que, bajo nuestras condiciones experimentales de inactivación, la BADH de amaranto existe como dos formas marcadamente diferentes en cuanto a la reactividad o accesibilidad de sus cisteina(s) susceptible(s) a la modificación por DSF, como ya se discutió. Si las cinéticas bifásicas se deben realmente a la presencia de dos formas de la enzima, se puede concluir de estos resultados que la unión de los ligandos a la forma más reactiva incrementa más su reactividad, mientras que su unión a la forma menos reactiva apenas si la afecta.

VIII. 3. CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA BADH MODIFICADA POR DSF Y POSIBLE MECANISMO DE INACTIVACIÓN

La conclusión de que la enzima sufre cambios estructurales importantes al modificarse por DSF está apoyada por el hecho de que la fluorescencia intrínseca de la enzima se altera profundamente después de una incubación con DSF, lo cual está hablando de un cambio en la estructura terciaria de la proteína. El apagamiento de la fluorescencia observado en la enzima tratada podría ser resultado de una transferencia de carga entre el o los residuo(s) de

Trp y el propio DSF, que al unirse al sitio activo estaría además, haciendo el ambiente de éste más hidrofóbico, lo que explicaría el corrimiento de la longitud de onda máxima de emisión. Es importante que nuestro modelo muestra cuatro residuos de Trp muy cercanos a la Cys 294, particularmente el residuo Trp 459 que a su vez está próximo a la Cys 453 (Fig. 34).

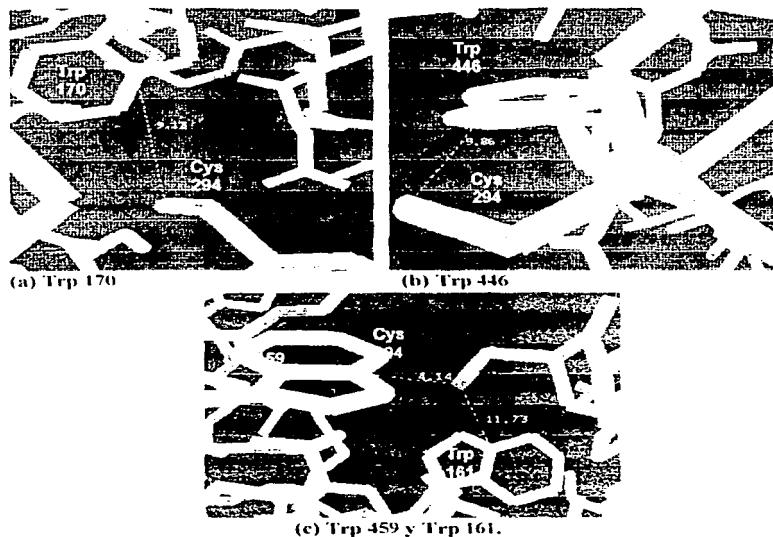


Figura 34. Residuos de triptofanos localizados en el sitio activo según el modelo tridimensional de la BADH de hoja de amaranto. Se muestran los residuos (a) Trp 170, (b) Trp 446 y (c) Trp 459 y Trp 161. Las distancias indicadas en las figuras entre los residuos de Trp y la Cys catalitica están dadas en Å.

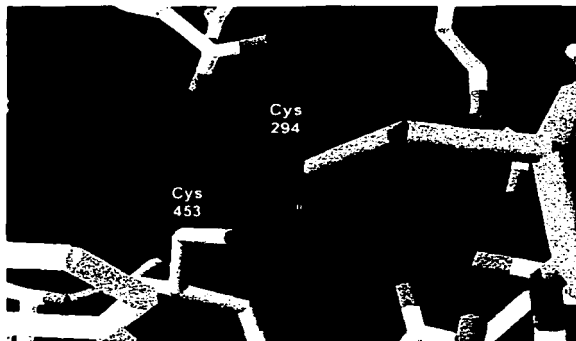


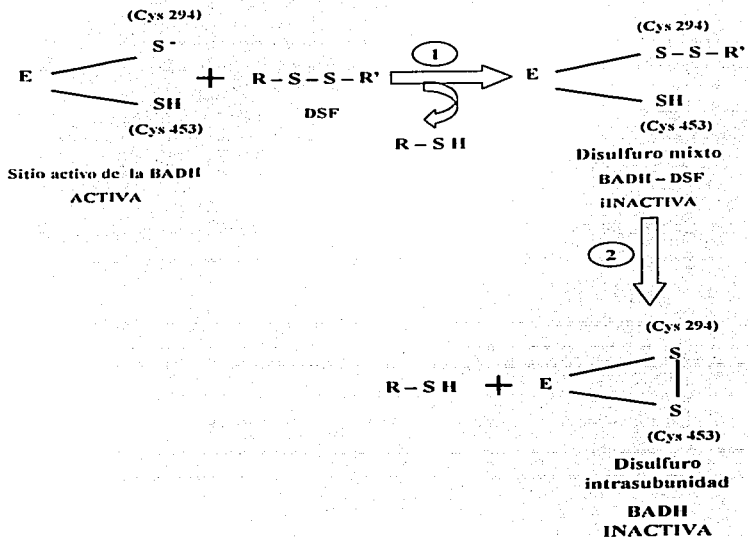
Figura 35. Residuos de cisteína en el sitio activo según el modelo tridimensional de la BADH de hoja de amaranto. Se muestran el residuo catalítico Cys 294 y el residuo de cisteína más próximo, Cys 453. La distancia entre ambos residuos es de 7.88 Å

La estructura nativa de la BADH de hoja de amaranto es un homodímero (Valenzuela-Soto y Muñoz-Clares, 1994). La agregación a tetrámeros o la disociación a monómeros produce inactivación de la enzima. En la secuencia aminoacídica de la enzima (Fig. 8) existen 16 residuos de cisteína por subunidad (Legaria *et al.*, 1998). Existía por tanto la posibilidad de que el DSF inactivase a la enzima por provocar cambios en su estado de asociación al modificarse químicamente a algun(os) residuo(s) de cisteína. Los resultados obtenidos en la cromatografía de exclusión molecular y en las electroforesis nativas muestran que éste no es el caso y fuertemente sugieren que la inactivación se debe a la modificación química de la cisteína catalítica altamente reactiva. Debe de tomarse en cuenta que el grupo tiol de este residuo de cisteína posee un pK_a anormalmente bajo, alrededor de 4 (Mújica-Jiménez, C. y Muñoz-Clares, R.A., resultados sin publicar), lo que permite que exista principalmente como tiolato al pH al que se realizaron estos experimentos y, por tanto, pueda reaccionar rápidamente con el agente modificante. Por el contrario, el grupo tiol del resto de los

residuos de cisteínas debe poseer valores de pK_a típicos, alrededor de 8.8, lo que los hace poco o nada reactivos a los valores de pH fisiológico. Quizás la excepción sea la Cys 453, que también está en las inmediaciones del sitio activo y, según nuestro modelo de la estructura tridimensional de la enzima, lo suficientemente próxima y con la orientación correcta para formar un disulfuro con el residuo catalítico, Cys 294 (Fig. 35). Los cambios en la movilidad electroforética de los monómeros, observados tanto en la electroforesis nativa a pH 8.8 como en SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras, podrían por tanto deberse a la formación de este disulfuro.

Ambos residuos se encuentran separados a 200 residuos de aminoácidos en la secuencia de la proteína, lo que explica que al formarse un puente disulfuro entre ellos la movilidad electroforética del monómero de la enzima aumente, tal como se observó, pues las subunidades se compactan y migran más rápidamente. Nuestros resultados, por tanto, sugieren que la modificación química por DSF de la BADH de hoja de amaranto ocurre en dos pasos, de acuerdo al esquema de la Figura 36.

El paso 1 conlleva la inactivación de la enzima y es muy rápido. El paso 2 debe ser más lento, porque la distancia entre los dos residuos de cisteína si bien permite la formación del disulfuro no es la óptima, y además porque la proporción del grupo tiol del residuo Cys 453 que existe como tiolato al pH del experimento, no debe ser tan alta como la del tiol del residuo catalítico. Sin embargo, este segundo paso no es posible observarlo en los experimentos cinéticos realizados en este trabajo porque la enzima se inactiva en el primero. Es probable que la formación de este disulfuro conlleve cambios irreversibles en la estructura de la enzima, aun cuando puede reducirse por la acción de agentes reductores, sobre todo por el DTT. Esto es consistente con el hallazgo de que el grado de reactivación



de la enzima depende del tiempo transcurrido después de la inactivación y con el hallazgo de que el puente disulfuro observado en la electroforesis se elimina por reducción con DTT o β -mercaptoetanol, pero no se recupera la actividad enzimática.

Con base en los hallazgos experimentales, el mecanismo propuesto de inactivación de la BADH por DSF se muestra en la Figura 36. Este mecanismo se asemeja al descrito por Myhre *et al.* (2001), que ocurre en la ALDH2, en el que se promueve la formación de un puente disulfuro intramolecular en la proteína, entre el residuo de cisteína esencial y uno próximo. Sin embargo, se requieren de experimentos adicionales para elucidar dicho mecanismo, tales como una mutagénesis sitio-dirigida o la espectrometría de masas que nos diría si se forma un disulfuro mixto o el disulfuro intrasubunidad.

La inactivación de la enzima por la formación de un disulfuro intrasubunidad, desde el punto de vista fisiológico, sería un importante punto de regulación ya que de esta forma la BADH podría recuperar su función catalítica una vez que ha sido inactivada.

IX. CONCLUSIONES

1. La actividad de la enzima BADI de hoja de amaranto es sensible al disulfiram.
2. La cinética bifásica de inactivación por disulfiram sugiere que existen dos formas de la enzima o dos diferentes sitios activos con muy diferente reactividad del residuo de cisteína esencial.
3. Los ligandos del sitio activo no protegen frente a la inactivación por disulfiram, por el contrario aumentan la velocidad de este proceso, indicando que su unión provoca un cambio conformacional en la enzima que lleva a una forma que posee un residuo de cisteína catalítico más reactivo.
4. El residuo de cisteína catalítica parece poder formar un puente disulfuro con un residuo de cisteína vecino; sin embargo, para poder concluir definitivamente a este respecto se requiere hacer mutagénesis sitio-dirigida de ambos residuos.
5. La posible existencia de dos formas de la enzima, el cambio en la reactividad de la cisteína catalítica provocado por los ligandos y la capacidad de este residuo de formar un puente disulfuro, podrían ser parte de la estrategia de la enzima para evitar la inactivación por oxidación en un ambiente de estrés osmótico sin comprometer su eficiencia catalítica.

Como conclusión general se puede decir que los hallazgos experimentales que se aportan en este trabajo permitieron llegar a un mejor entendimiento acerca de la modulación de la reactividad de la cisteína catalítica y su regulación en esta importante enzima. Además sentaron las bases para estudios futuros con herbicidas análogos al disulfiram.

X. PERSPECTIVAS

1. Es importante investigar más a fondo la posible existencia de las dos formas de la BADH y, en su caso, determinar su origen. Se tendrá que comprobar por isoelectroenfoque si existen dos formas que difieren en su pI, y/o por espectrometría de masas si las diferencias son en tamaño.
2. Es necesario corroborar el mecanismo de inactivación por DSF propuesto, mediante técnicas especializadas como la espectrometría de masas y la mutagénesis sitio-dirigida. Para el último punto, se requiere lograr la expresión de la enzima BADH de amaranto en organismos tales como bacterias o levaduras.
3. Como se ha mencionado, existen herbicidas tiocarbamatos de gran uso cuya estructura química es altamente parecida a la del disulfiram, por lo que se tiene interés en caracterizar el efecto de estos agentes sobre la BADH de hoja de amaranto.

XI. REFERENCIAS

1. Alejandro-Iturbide, G. y Gómez-Lorence, F. 1986. Cultivo del amaranto. Colecc. Cuadernos Universitarios Serie agronómica No. 12, UACH. México.
2. Arakawa, K., Takabe, T. 1990. Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley. *Plant Cell Physiol.* 31, 797-803.
3. Arakawa, K., Mizuno, K., Kishitani, S., Takabe, T. 1992. Immunological studies of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol.* 33, 833-840.
4. Biehler, K., Fock, H. 1996. Evidence for the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat. *Plant Physiol.* 112, 265-272.
5. Bonhert, H.J., Nelson, D.E., Jensen, R.G. 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1011.
6. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
7. Brown, A.D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40, 803-846.
8. Coughlan, S.J., Wyn Jones, R.G. 1982. Glycine betaine biosynthesis and its control in detached leaves of spinach. *Planta* 154, 6-17.
9. Del Rio Portilla, M.A. 1988. El contenido relativo de agua. Características en *Amaranthus hypochondriacus* L. Tesis de Licenciatura. FES, Zaragoza. México.
10. 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.
11. Dure, L. III. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* 3, 363-369.
12. Falkenberg, P., Strom, A.R. 1990. Purification and characterization of osmoregulatory betaine aldehyde dehydrogenase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 253-259.
13. Farres J., Wang, T. T. Y., Cunningham, S.J., Weiner, H. 1995. Investigation of the active site cysteine residue of rat liver mitochondrial by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 34, 2592-2598.

14. Feldman, R.I. y Weiner, H. 1972. Horse liver aldehyde dehydrogenase characterization. *J. Biol. Chem.* 247, 260-266.
15. Flores-Zenil, Maribel. 1994. Rendimiento, calidad colectas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) sometidos a fertilización potásica. Tesis, Universidad Autónoma de Chapingo, Departamento de Fitotecnia.
16. Gamboa, A., Valenzuela-Soto, E.M., Murillo, E. 1991. Biochemical changes due to water loss in leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. *J. Plant Physiol.* 137, 586-590.
17. Gibon, Y., Bessieres, M.A., Larcher, F. 1997. Is glycine betaine a non-compatible solute in higher plants that do not accumulate it? *Plant Cell Env.* 20, 329-340.
18. 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.
19. Hall, J.L., Harvey, D.M.R., Flowers, T.J. 1978. Evidence for the cytoplasmic localization of betaine in leaf cells of *Suaeda maritima*. *Planta* 140, 59-62.
20. Hanson, A.D., May, A.M., Grumet, R., Bode, J., Jamieson, G.C. y Rhodes, D. 1985. Betaine synthesis in chenopods: localization in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3678-3682.
21. Hart, B. W., Faiman, M. D. 1994. In vivo pharmacodynamic studies of the disulfiram metabolite S- methyl N-N- diethylthiolcarbamate sulfoxide: inhibition of liver ALDH. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 18, 340-345.
22. Hayashi, H., Mustardy, L., Deshnum, P., Ida, M., Murata, N. 1997. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *cod A* gene for choline oxidase: accumulation of glycine betaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* 12, 133-142.
23. Hempel, J., von Bahr-Lindstrom, H., Jornvall, H. 1984. Aldehyde dehydrogenase from human liver: Primary structure of the cytoplasmic isoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 141, 21-35.
24. Hempel, J., Nicholas, H. y Ronald, L. 1993. Aldehyde dehydrogenases: Widespread structural and functional diversity within a shared framework. *Prot. Sci.* 2, 1890-1900.
25. Jacoby, W.J. 1963. Aldehyde dehydrogenases. En: Boyer, P.D. (ed.). *The enzymes*, Vol. 7, 2nd ed., academic Press, New York. 203-221 pp.

26. Johansson, K., El-Ahmad, M., Ramasawamy, S., Hjelmqvist, L., Jorvall, H., Eklund H. 1998. Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Prot. Sci.* 7, 2106-2117.
27. Kathmann, E.C., Naylor, S. y Lypsky, J.J. 2000. Rat liver constitutive and phenobarbital inducible cytosolic aldehyde dehydrogenases are highly homologous proteins that function as distinct isozymes. *Biochemistry* 39, 11170-11176.
28. 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.
29. Kitson, T. M. 1987. Effect of disulfiram on the pre-steady-state burst in the reactions of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* 248, 989-991.
30. Kitson, T.M., Kitson, K.E. 1996. The action of cytosolic aldehyde dehydrogenase on resorufin acetate. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 6*, Editores Plenum Press, New York, 201-208 pp.
31. Koivusalo, M., Lindros, K. O. 1996. Phenethyl isothiocyanate as an inhibitor of aldehyde dehydrogenases. *Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl Metabolism 6*, Editores Plenum Press, New York, 225-232 pp.
32. Koivusalo, M., Rautoma, P. 1987. The cytoplasmic aldehyde dehydrogenase induced in rat liver by xenobiotics. Kinetic studies and studies on esterase activity. *Prog. Clin. Biol. Res.* 232, 135-147.
33. Krzywicki, K.A., Brandriss, M.C. 1984. Primary structure of the nuclear PUT2 gene involved in the mitochondrial pathway for proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4, 2837-2842.
34. Kurys, G., Ambroziak, W., Pietruszco, R. 1989. Human aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 264, 4715-4721.
35. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
36. Lam, J.P., Mays, D.C., 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.
37. Legaria, J., Rajsbaum, R., Muñoz-Clares, R.A., Villegas-Sepúlveda, J., Simpson, J., 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.

38. Lindahl, R., Hempel, J. 1991. Aldehyde dehydrogenase: What can be learned from a baker's dozen sequences? *Adv. Exp. Med. Biol.* 284, 1-8.
39. Lippert, K., Galinski, E.A. 1992. Enzyme stabilization by ectoine-type compatible solutes: protection against heating, freezing and drying. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37, 61-65.
40. Lipsky, J., Shen, M., Naylor, S. 2001. Overview – *In vitro* inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. *Chem.– Biol. Interact.* 130-132, 81-91.
41. Liu, Z., Sun, Y.J., Rose, J., Chung, Y., Hsiao, Ch.D., Chang, W.R., Ingrid, K., Perozich, J., Lindahl, R., Hempel, J., Wang, B. Ch. 1997. The first structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions between NAD and the Rossmann fold. *Nat. Struct. Biol.* 4, 317-326.
42. MacGibbon, K.H., Motion, L.R., Crow, K.E., Buckley, P.D., Blackwell, L.F. 1979. Purification and properties of sheep-liver aldehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 96, 585-595.
43. Marchner, H., Totmar, O. 1983. Studies on the inactivation of mitochondrial rat – liver aldehyde dehydrogenase by the alcohol – sensitizing compounds, cyanamide, 1-aminocyclopropanol and disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2181-2188.
44. Mays, D.C., Nelson, A.N., Fauq, A.H., Shriver, Z.H., Veverka, K.A., Naylor, S., Lipsky, J.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.
45. Mays, D.C., Ortiz-Bermudez, P., Lam, J.P., Tong, I.H., Fauq A.H., Lipsky, J.J. 1998. Inhibition of recombinant human mitochondrial aldehyde dehydrogenase by two intermediate metabolites of disulfiram. *Biochem. Pharmacol.* 55, 1099-1103.
46. McKerrell, A. D., Vallari, R., Pietruszko, R. 1985. Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase inhibition by diethylthiocarbamic acid methanethiol mixed disulfide: a derivative of disulfiram. *FEBS Lett.* 179-1, 77-81.
47. Meister, A. 1983. Metabolism and transport of glutathione and other γ -glutamyl compounds. In: *Functions of glutathione. Biochemical, Physiological, Toxicological and Clinical Aspects*, Raven Press, New York, 1-22 pp.
48. Montero-Morán, G., Álvarez-Añorve, L.I., Lara-González, S. 2001. La modificación química de las enzimas. ¿Un enfoque experimental anticuado? *Boletín de Educación Bioquímica* 20 (1), 30-38.
49. Muñoz-Clares, R.A., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., 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.
50. Muñoz-Clares, R.A., Mújica-Jiménez, C. 2001. Complexes of NADH with betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of the plant *Amaranthus hypochondriacus* L. Chem.-Biol. Interact. 130-132, 71-80.
 51. Myhre, G., Floyd, B.N., Mays, D.C., Macomber, D.W., Lipsky, J.J. 2001. Selectivity of disulfiram and its metabolites for human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. FASEB J. 15, A919-A919.
 52. Nagasawa, T., Kawbata, Y., Ogata, K. 1976. Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*. A-16. Agr. Biol. Chem. 40, 1743-1749.
 53. Nakamura, T., Yokata, S., Muramoto, Y., Tsutsui, K., Oguri, Y., Fukui, K., Takabe, T. 1997. Expression of a betaine aldehyde dehydrogenase gene in rice, a glycinebetaine nonaccumulator, and possible localization of its protein in peroxisomes. Plant J. 11, 1115-1120.
 54. Ni, L., Sheik, S., Weiner, H. 1997. Involvement of glutamate 399 and lysine 192 in the mechanism of human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. J. Biol. Chem. 272, 18823-18826.
 55. Niegmann, E., Schulz, A., Bartsch, K. 1992. Sequence of *E. coli* succinic semialdehyde dehydrogenase. Submission to Swiss-Prot database (accession Gabd Ecoli).
 56. Nyysölä, A. 2001. Pathways of glycine betaine synthesis in two extremely halophilic bacteria, *Actinopolyspora halophila* and *Ectothiorhodospira halochloris*. Thesis, Helsinki University of Technology, Finland
 57. Orthen, B., Popp, M., Smirnof, N. 1994. Hydroxyl radical scavenging properties of cyclitols. Proc. Royal Soc. Edin. 102B, 269-272.
 58. Penefsky, H.S. 1977. Reversible binding of P_i by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. 252, 2891-2899.
 59. Petronini, P.G., De Angelis, E.M., Borghetti, P., Borghetti, A.F., Wheeler, K.P. 1992. Modulation by betaine of cellular responses to osmotic stress. Biochem. J. 282, 69-73.
 60. Polgár, L. 1976. On the mode of activation of the catalytically essential sulfhydryl group of papain. Eur. J. Biochem. 33, 104-109.
 61. Pollard, A., Win Jones, R.G. 1979. Enzyme activities in concentrated solutions of glycine betaine and other solutes. Planta 144, 291-298.

62. Quistad, G.B., Sparks, S.E., Casida, J.E. 1994. Aldehyde dehydrogenase of mice inhibited by thiocarbamate herbicides. *Life Sci.* 55, 1537-1544.
63. Racker, E. 1949. Bovine liver aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 177, 883-892.
64. Rathinasabapathi, B., Burnet, M., Russell, B.L., Gage, D.A., Liao, P.C., Nye, G. J., Scott, P., Goldbeck, J.H., Hanson, A.D. 1997. Cholinemonooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalysing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94, 3454-3458.
65. Rhodes, D., Hanson, A. D. 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol.* 44, 357-384.
66. Rivett, A. J., Tipton, K. F. 1981. Kinetic studies with rat-brain succinialdehyde dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 177, 187-193.
67. Sheik, S., Ni, L., Hurley, T. D., Weiner, H. 1997. The potential roles of the conserved amino acids in human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272, 18817-18822.
68. Shen, M.L., Johnson, K. L., Mays, D.C., Lipsky, J.J., Naylor, S. 2001. Determination of *in vivo* adducts of disulfiram with mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Biochem. Pharmacol.* 61, 537-545.
69. Smirnov, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125, 27-58.
70. Smirnov, N. 1995. Metabolic flexibility in relation to the environment. In *Environment and Plant Metabolism*. Edited by Smirnov N. Oxford: Bios Scientific Publishers; 1-16 pp.
71. Smirnov, N., Cumbes, Q.J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry* 26, 1057-1060.
72. Steinmetz, C., G., Xie, P., Weiner, H., Hurley, D. H. 1997. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component of ethanol aversion. *Structure* 5, 701-711.
73. Stepokuns, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 543-584.
74. Strom, A.R., Le Rudulier, D., Jakowec, M.W., Bunnell, R.C., Vallentine, R.C. 1983. Genetic engineering of plants. Plenum, New York. 39-59 pp.

75. Styrvoid, O. B., Falkenberg, P., Landfald, B., Eshoo, M.W., Bjornsen, T., Stroem, A.R. 1986. Selection, mapping and characterization of osmoregulatory mutants of *Escherichia coli* blocked in the choline-glycine betaine pathway. *J. Bacteriol.* 165, 856-863.
76. Trinidad-Santos, A. y Gómez-Lorence, F. 1986. El cultivo del amaranto. Primer Coloquio Nacional del Amaranto. México, 1-301 p.p
77. Trinidad-Santos, A. 1990. El amaranto (*Amaranthus spp.*): su cultivo y aprovechamiento. Chapingo. Edo. de México. 577 pp.
78. Trossat, C., Rathinasabapathi, B., Hanson, A.D. 1997. Transgenically expressed betaine aldehyde dehydrogenase efficiently catalyses oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde and omega-aminoaldehydes. *Plant Physiol.* 113, 1457-1461.
79. Valenzuela-Soto, E.M., Muñoz-Clares, R.A. 1993. Betaine aldehyde dehydrogenase from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L. exhibits an Iso ordered Bi Bi steady state mechanism. *J. Biol. Chem.* 268, 23818-23824 (additions and corrections, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 4692).
80. Valenzuela-Soto, E.M., 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.
81. Vallari, R., Pietruszko, R. 1982. Human aldehyde dehydrogenase: Mechanism of inhibition by disulfiram, *Science* 216, 637-639.
82. Velasco-García, R. 2000. Purificación y caracterización de betaina aldehído deshidrogenasa de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Doctorado, UNAM.
83. Velasco-García, R., Chacón-Aguilar, V.M., Hervert-Hernández, D., Muñoz-Clares, R.A. 2003. Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* leaves by disulfiram. *Chem.-Biol. Interact.* 143-144, 149-158.
84. Velasco-García, R., González-Segura, L., Muñoz-Clares, R.A. 2000. Steady-state kinetic mechanism of NADP⁺- and NAD⁺-dependent reactions catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem. J.* 352, 675-683.
85. Veverka, K.A., Johnson, K., Mays, D.C., Lipsky, J.J., Naylor, S. 1997. Inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and its metabolite methyl diethylthiocarbamoyl-sulfoxide. *Biochem. Pharmacol.* 53, 511-518.
86. Vojtechová, M., Rodríguez-Sotres, R., Valenzuela-Soto, E.M., Muñoz-Clares, R.A. 1997. Substrate inhibition by betaine aldehyde of betaine aldehyde dehydrogenase

from leaves of *Amaranthus hypochondriacus* L., Biochim. Biophys. Acta 1341, 49-57.

87. Vojtechová M., Hanson A.D., Muñoz-Clares R.A. 1997. Betaine-aldehyde dehydrogenase from amaranth leaves efficiently catalyses the NAD-dependent oxidation of dimethylsulfoniopropionaldehyde to dimethylsulfoniopropionate. Arch. Biochem. Biophys. 337, 81-88.
88. Wang, X., Weiner, H. 1995. Involvement of glutamate 268 in the active site of human liver mitochondrial (Class 2) aldehyde as probed by site-directed mutagenesis. Biochemistry 34, 237-243.
89. Weigel, P., Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D. 1986. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. Plant Physiol. 82, 735-759.
90. Weiner, H., Farrés, J., Rout, U. J., Wang, X., Zheng, Ch. F. 1995. Site directed mutagenesis to probe for active site components of liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. Enzymology and Molecular Biology of Carbonyl metabolism 5. Editores Plenum Press, New York. pp. 1-7.
91. Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D. 1988. Betaine aldehyde dehydrogenase polymorphism in spinach: genetic and biochemical characterization. Biochem. Genet. 26, 143-151.
92. Weretilnyk, E.A., 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.
93. Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D. 1990. Molecular cloning of a plant betaine aldehyde dehydrogenase implicated in adaptation to salinity and drought. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2745-2749.
94. Wray, W., Bouliskas, T., Wray, V.P., Hancock, R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 118, 197-203.
95. Wyn Jones, R.G., Storey, R., Leight, R.A., Ahmad, N., Pollard, A. 1977. In regulation of cell membrane activities in plants. North Holland, 121-136 pp.
96. Yoshida, A., Rzhetsky, A., Hsu, L. C., Chang, Ch. 1998. Human aldehyde dehydrogenase gene family. Eur. J. Biochem. 251, 549-557.

APÉNDICE

Artículo: "Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram"



Inactivation of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* L. leaves by disulfiram

Roberto Velasco-García^a, Víctor M. Chacón-Aguilar^a,
Deisy Hervert-Hernández^b, Rosario A. Muñoz-Clares^{b,*}

^a Laboratorio de Osmorregulación, FES-Enecala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Batios No. 1, Tlalpampanh, Estado de México 54090, México

^b Departamento de Ingeniería, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Ciudad Universitaria 04510, México

Abstract

Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) activity might be crucial for the growth of the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa* under conditions of infection and therefore appears to be a suitable target for antimicrobial agents. As a first step in the search for BADH inhibitors, we have tested the effects of the known aldehyde dehydrogenase inhibitor disulfiram (DSF) on the activity of *P. aeruginosa* and *Amaranthus hypochondriacus* (amaranth) leaf BADHs. DSF totally inactivated both enzymes in a time- and dose-dependent manner. In the case of the *Pseudomonas* enzyme, inactivation kinetics were monophasic with a second-order inactivation rate constant at pH 6.9 of $4.9 \pm 0.4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, whereas the plant enzyme was inactivated in a biphasic process with second-order inactivation rate constants at pH 7.5 of 6.8 ± 0.6 and $0.33 \pm 0.04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. At pH 8.8, the second-order rate constants for inactivation of the bacterial enzyme was $1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, which compare well with that reported for human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2), the target of DSF inhibition in the aversion therapy of alcoholism. Both BADHs were inactivated faster in the presence of NAD(P)⁺ than in its absence, whereas NAD(PH) and betaine aldehyde protected the bacterial, but increased the inactivation rate of the plant enzyme. The inactivated enzymes were reactivated by dithiothreitol, but not by a high concentration of the physiological reductant glutathione. The high *in vitro* sensitivity of the *Pseudomonas* BADH to DSF, particularly in the presence of NAD(P)⁺, together with the lack of reversibility of DSF modification by glutathione, makes this inhibitor a potential antimicrobial agent and suggests that it might be worth testing its effects and those of its metabolites *in vivo*, under culture conditions in which the activity of BADH is required for growth of the bacteria.

© 2002 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Betaine aldehyde dehydrogenase; *Pseudomonas aeruginosa*; *Amaranthus hypochondriacus* L.; Disulfiram; Cysteine modification; Conformational changes

* Corresponding author. Tel.: +52-55-5622-5276; fax: +52-55-5622-5329

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

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen that can grow on glycine betaine or glycine betaine precursors, such as phosphatidylcholine, acetylcholine, phosphorylcholine and choline, as the sole source of carbon and nitrogen. These compounds are very abundant in the infection sites of this bacterium [1–3] and their presence induces the synthesis of the enzyme betaine aldehyde dehydrogenase (BADH, EC 1.2.1.8) [4]. BADH catalyzes the irreversible oxidation of betaine aldehyde to glycine betaine with the concomitant reduction of NAD(P)^+ to NAD(P)H . Glycine betaine is a quaternary ammonium compound that plays an important role as osmoprotectant in the response of a wide variety of cells to osmotic stress [5,6], a condition which is frequently present in *P. aeruginosa* infection sites, such as in the lungs of patients suffering from cystic fibrosis [7]. In fact, *P. aeruginosa* is able to grow under osmotic stress, particularly in the presence of the osmoprotectant glycine betaine or its precursors [8,9] and it has been suggested that its virulence might be related to its ability to adapt to this stress [10]. Glycine betaine may, therefore, play the dual role of an osmoprotectant and a metabolic intermediate in this bacterium. Thus, BADH activity might be crucial for bacterial growth under conditions of infection, i.e. osmotic stress plus abundance of glycine betaine precursors and so it seems to be a suitable target for antimicrobial agents. Inhibition of this enzymatic activity would starve the bacteria grown in glycine betaine precursors and/or seriously affect their ability to withstand osmotic stress. It would also stop growth, even if glycine betaine is present, due to the toxic effect of the build-up of betaine aldehyde, as has been found in a *P. aeruginosa* mutant deficient in BADH activity [11].

One of the best known and widely used aldehyde dehydrogenase inhibitors is disulfiram (bis(diethylthiocarbamoyl) disulfide, DSF), a drug long used in aversion treatment of alcoholism. DSF irreversibly inhibits the liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2), causing accumulation of acetaldehyde resulting in the undesirable

effects called 'disulfiram-ethanol' reaction [12]. Although DSF is metabolized to produce diethylthiocarbamate and methyl diethylthiocarbamoyl-sulfoxide (MeDTCSO), which are also potent ALDH inhibitors, [13], DSF might still be involved in the *in vivo* inhibition of ALDH2, for a certain amount of diethylthiocarbamate can be reoxidized to form intracellular DSF [14,15]. The human isozyme E3 ALDH or ALDH9 is a BADH [16] relatively insensitive to DSF inhibition [17]. To the best of our knowledge, no other BADH has been investigated in respect to DSF sensitivity. So, as a first step in the search for inhibitors, we have tested the effects of DSF on the activity of *P. aeruginosa* BADH. In an attempt to better understand the mechanism of inhibition and to investigate whether or not this compound could be used as a specific inhibitor of the bacterial enzyme, we also studied its effects on a structurally and functionally different BADH, that from *Amaranthus hypochondriacus* (amaranth) leaves. The enzyme from *P. aeruginosa* is tetrameric [18], as is ALDH9 [17] and uses NADP^+ and NAD^+ as coenzyme [19,20], whereas that from amaranth is dimeric and shows a marked preference for NAD^+ [21]. In this work, we described the inactivating effects of DSF on both BADHs in the absence and presence of several ligands.

2. Material and methods

P. aeruginosa and amaranth BADHs were purified to homogeneity and stored in the presence of 2-mercaptoethanol, as described [19,21]. Before treatment with DSF, the BADH preparations were twice rapidly gel-filtered following the method described by Penélsky [22] to remove 2-mercaptoethanol. The gel-filtration buffers were: for *P. aeruginosa* BADH, 50 mM potassium phosphate, pH 6.9, containing 1 mM EDTA and 25 mM KCl (buffer A); for amaranth BADH, 50 mM Hepes-KOH, pH 7.5, containing 1 mM EDTA, 180 mM KCl and 10% (v/v) glycerol (buffer B). All solutions were saturated with nitrogen just before use to prevent air oxidation of the cysteine residues. DSF stock solution (2.5 mM) was prepared in

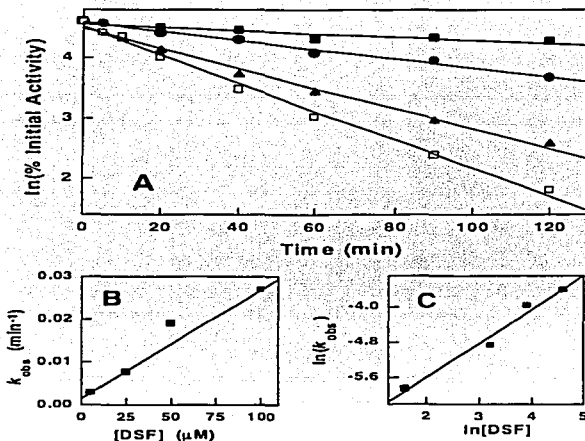


Fig. 1. Time-courses of inactivation of *P. aeruginosa* BADH by DSF. (A) The enzyme (0.6 μM as the tetramer) was incubated at 37 °C in buffer A plus 5 μM (■), 25 μM (●), 50 μM (▲) or 100 μM (□) DSF. (B) Dependence of the pseudo-first-order rate constant for inactivation on DSF concentration and determination of the second-order rate constant for inactivation. (C) Determination of the reaction order on DSF from the data in (B).

absolute ethanol and enzyme ligands were dissolved in nitrogen-saturated water. *P. aeruginosa* or amaranth BADH were incubated with appropriate concentrations of DSF, in the absence or presence of ligands, in buffers A or B, respectively. Ligands and DSF were added simultaneously to the enzyme preparations. At the indicated time intervals, aliquots were removed and enzyme activity assayed as described [19,21]. Activity data were analyzed by nonlinear regression.

3. Results and discussion

3.1. Inactivation of *P. aeruginosa* and amaranth BADHs by DSF

Enzyme inactivation by DSF under pseudo-first order conditions occurred in a time- and dose-dependent manner (Fig. 1(A) and Fig. 2(A)). In the absence of DSF, but presence of 2% (v/v) methanol as the DSF vehicle, no changes in

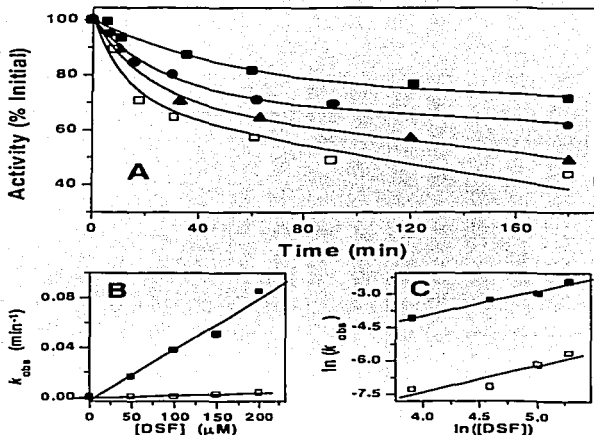


Fig. 2. Time courses of inactivation of amaranth BADH by DSF. (A) The enzyme (1.3 μM as the dimer) was incubated at 30 °C in buffer B plus 50 μM (■), 100 μM (●), 150 μM (▲) or 214 μM (□) DSF. (B) Dependence of the rate constants for inactivation on DSF concentration and determination of the second-order rate constant for inactivation. (C) Determination of the reaction order on DSF from the data in (B).

enzymatic activities were observed. Inactivation kinetics of *P. aeruginosa* BADH were monophasic (Fig. 1A), whereas those of the amaranth enzyme were biphasic (Fig. 2A). The pseudo-first-order rate constants of inactivation, k_{obs} , estimated by fitting the experimental data to a single or double exponential decay equation by nonlinear regression, as appropriate, were linearly dependent on DSF concentration (Fig. 1(B) and Fig. 2(B)). The absence of curvature suggests that over the concentration range used no significant enzyme-DSF complex accumulated during inactivation. From the slopes of the lines in Fig. 1(B) and Fig. 2(B), we estimated inactivation second-order rate constants, k_{inact} , values of $4.90 \pm 0.39 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for

P. aeruginosa BADH and of 6.81 ± 0.61 and $0.33 \pm 0.04 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, for the fast and slow inactivation phases, respectively, of the amaranth enzyme. Using the equation:

$$\ln k_{obs} = \ln k_{inact} + n \ln[DSF],$$

where n is the order of inactivation with respect to DSF, we estimated n values of 0.77 ± 0.09 for the bacterial enzyme and of 1.12 ± 0.10 for the fast phase and 1.19 ± 0.38 for the slow phase of inactivation of the plant enzyme (Fig. 1(C) and Fig. 2(C)). These values indicate that the loss of catalytic activity was first-order with respect to DSF for both enzymes.

In the case of the amaranth BADH, the amplitude of the fast and slow phases, 25 and 75%, respectively, were the same at any DSF concentration tested. It is interesting that the biphasic inactivation kinetics with similar phase amplitudes were obtained with others thiol modifying reagents, such as iodoacetamide [23]. As discussed in the last cited paper, the biphasic inactivation is most likely due to the existence of two amaranth BADH conformers with different reactivity or accessibility of their catalytic thiolates. Since the proportion of both forms would be given by the amplitude of the phases, under our experimental conditions, the more reactive form would be 25% and the less reactive 75% of the total BADH protein.

At pH 8.8, the reaction of *P. aeruginosa* BADH with DSF was too rapid for the accurate determination of the inactivation kinetics by assaying the for residual enzyme activity. Nevertheless, a second-order rate constant could be estimated to be at least $1000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. This value compares well with that reported by Myhre et al. [24] for the reaction of DSF with human ALDH2, $840 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, under conditions similar to ours. Under the same conditions, the second-order rate constant of the fast phase of amaranth BADH inactivation was $1.53 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and that of the slow phase $2.99 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Interestingly, the amplitude of the fast and slow phases, 22 and 78%, respectively, were similar to those obtained at pH 7.5, indicating that the increase in pH did not affect the relative concentration of the putative enzyme forms.

BADH inactivation by DSF most probably involves the modification of the essential cysteine residue, as in ALDH2 [25] where it might promote the formation of a protein intramolecular disulfide bridge between the essential and a proximal cysteine residues. *P. aeruginosa* BADH has three nonessential cysteines [26] in addition to the essential one, Cys286, but the three-dimensional model of this enzyme, obtained from the crystal coordinates of cod liver BADH [27], indicates that none is close enough to Cys286 to form a disulfide bridge. In accordance, the three site-directed BADH mutants, in which the nonessential Cys residues have been changed to Ala [26], were also

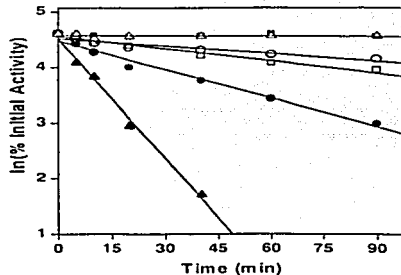


Fig. 3. Effect of enzyme-ligands on the inactivation of *P. aeruginosa* BADH by DSF. BADH was incubated without (●) or with 50 μM DSF in the absence (■) or presence of the following ligands: 3.7 mM NADPH (○), 3.7 mM betaine aldehyde (□), 3.7 mM NADPH (○) and 3.7 mM betaine aldehyde plus 3.7 mM NADPH (△). Other conditions were as in Fig. 1. The lines were obtained by linear regression of the data.

Table 1
Pseudofirst-order rate constants for the inactivation of *P. aeruginosa* BADH by 50 μM DSF in the absence or presence of different enzyme-ligands.

Ligand (3.7 mM)	k_{obs} (min^{-1}) ($\times 10^{-3}$)
None	20 \pm 2.2
NADP*	82.6 \pm 5.5
NAD*	122 \pm 8.9
NADPH	4.8 \pm 0.9
NADH	3.2 \pm 0.9
BA	7.9 \pm 0.7
NADPH + BA	0
NADH + BA	0

Values \pm SE were estimated by a fit of the inactivation data to a single exponential decay equation using nonlinear regression. BA, betaine aldehyde.

inactivated by DSF with similar kinetics to those of the wild enzyme (not shown). These results prove that inactivation of *P. aeruginosa* BADH by DSF is due to the formation of a mixed disulfide between the essential Cys residue and DSF. The

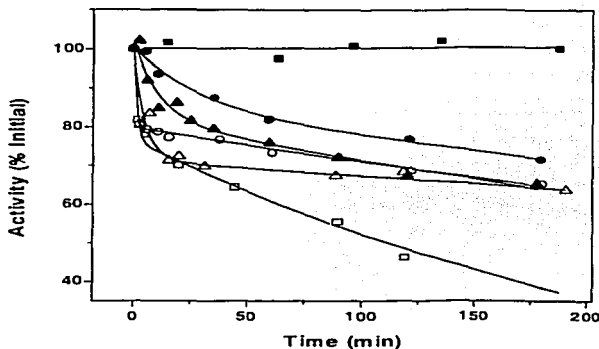


Fig. 4. Effect of enzyme-ligands on the inactivation of amaranth BADH by DSF. The enzyme was incubated without (■) or with 50 μ M DSF in the absence (●) or presence of the following ligands: 0.2 mM NAD^+ (▲), 0.2 mM betaine aldehyde (□), 0.2 mM NADH (○), and 0.2 mM betaine aldehyde plus 0.2 mM NADH (△). Other conditions were as in Fig. 2. The lines are the best fit of the inactivation data to the equation for a single exponential decay by nonlinear regression.

three-dimensional model of amaranth BADH does show a Cys residue close to the essential one and it is then possible that in this case, DSF-inactivation involves the formation of a disulfide between these two Cys residues. Further experiments are needed to clarify the mechanism of BADH inactivation by DSF.

3.2. Effects of ligands on BADH inactivation by DSF

Incubation of *P. aeruginosa* BADH with DSF in the presence of NADP^+ enhanced the inactivation rate, whereas betaine aldehyde or NADPH protected the enzyme against inactivation. When present together in the inactivation medium, betaine aldehyde and NADPH afforded total protection (Fig. 3). Qualitatively and quantitatively similar results were obtained with NAD^+ and NADH. Table 1 gives the values of the first-order rate constants for inactivation by DSF in the

presence of ligands, estimated by nonlinear regression of the experimental data.

The protection against inactivation afforded by betaine aldehyde is consistent with the kinetics of *P. aeruginosa* BADH. As the kinetic mechanism is steady-state random [20], the aldehyde can bind to the active site in the absence of the coenzyme and then protect against inactivation through a steric effect. The results obtained with the oxidized coenzymes agree with the coenzyme-induced increases in the reactivity or accessibility of the essential Cys towards methyl methanethiosulphonate (MMTS) recently reported [28]. However, the decrease in the rate of DSF-mediated inactivation in the binary complexes enzyme-NADH and enzyme-NADPH contrasts with the increases previously found in MMTS-mediated inactivation [28]. These discrepancies might be explained by the differences in size of the two thiol reagents. Even though all binary complexes of enzyme and coenzymes behaved similarly with respect to a

Table 2
Amplitudes and first-order constants for the inactivation of amaranth BADIH by 50 μ M DSF in the absence or presence of different enzyme-ligands

Ligand (0.2 mM)	Amplitude ₁ (%)	$k_{\text{obs}1}$ (min^{-1}) ($\times 10^{-3}$)	Amplitude ₂ (%)	$k_{\text{obs}2}$ (min^{-1}) ($\times 10^{-3}$)
None	25.2 \pm 1.2	19.0 \pm 3.6	75*	0.3 \pm 0.2
NAD ⁺	20.0 \pm 3.6	88.8 \pm 37.8	82.0 \pm 3.4	1.4 \pm 0.4
NADH	20.2 \pm 1.3	1019 \pm 400.0	79.8 \pm 0.6	1.2 \pm 0.1
BA	23.2 \pm 3.1	668 \pm 248.8	76.7 \pm 1.8	3.8 \pm 0.4
NADH + BA	26.8 \pm 4.3	192 \pm 70	71.3 \pm 5.8	0.6 \pm 0.4

* Values \pm S.E. were estimated by a fit of the inactivation data to a single or double exponential decay equation, using nonlinear regression. BA, betaine aldehyde.

* This value was fixed in the fitting procedure.

small thiol reagent, such as MMTS, the use of the bulkier DSF as a modifying reagent shows that the oxidized and reduced coenzymes bind differently in *P. aeruginosa* BADIH active site pocket. Apparently, NADH and NADPH bind in a manner that diminishes the accessibility of the essential thiolate to a bulky reagent, whereas NAD⁺ and NADP⁺ have the opposite effect. Differences in the binding of the oxidized and reduced coenzymes have also been noted in studies of the three-dimensional structure of the holoenzymes forms of other aldehyde dehydrogenases [29]. The increase in the DSF-mediated inactivation of the enzyme produced by NAD(P)⁺ might be relevant for the possible use *in vivo* of this inhibitor, or its metabolites, since it is most likely that an important proportion of the total enzyme exists as binary complexes with the oxidized coenzymes. In this respect, *P. aeruginosa* BADIH would be even more susceptible to inhibition by these compounds than rat liver ALDH2, which was found to be completely protected against inactivation by NAD⁺ [30].

In amaranth BADIH all ligands, particularly betaine aldehyde, promoted a greater rate of inactivation by DSF, mostly by increasing the inactivation rate of the first phase, but they did not change the phase amplitudes (Fig. 4 and Table 2). NADH notably increased the inactivation rate constant of the first phase, while it barely affected that of the second phase. NAD⁺ provoked a much smaller increase in reactivity than the binding of NADH (Table 2). In the presence of betaine aldehyde, the inactivation kinetics of amaranth BADIH resembled those obtained in

the presence of NADH, although the aldehyde-induced increase of the slow rate constant was higher than that induced by the reduced coenzyme. If the biphasic kinetics of inactivation are indeed due to the presence of two amaranth BADIH forms, as discussed above and elsewhere [23], it might be concluded from our results that binding of betaine aldehyde and NADH to the first reacting one is very different from that of NAD⁺, while the three ligands appears to bind similarly to the slow reacting form.

The increases in reactivity towards DSF promoted by all ligands on binding to the amaranth enzyme indicate a rapid, ligand-induced conformational change, in agreement with the findings of another study in which iodoacetamide was used [23]. However, the results of these two studies are contrasting since increased inactivation was found in the experiments with DSF reported here, whereas decreased inactivation was observed in those with iodoacetamide reported in the other study [23]. In addition to the chemical and structural differences between the two reagents, the differences in the experimental conditions of the two studies, particularly those concerning the preincubation period of the enzyme with the ligand, might account for these discrepancies.

The results obtained with betaine aldehyde are intriguing for two reasons. First, they indicate that the substrate binds to the enzyme in the absence of the coenzyme at the relatively low concentration used in this experiment, 0.2 mM. However, it is known that amaranth BADIH follows a steady-state ordered mechanism at low concentration of

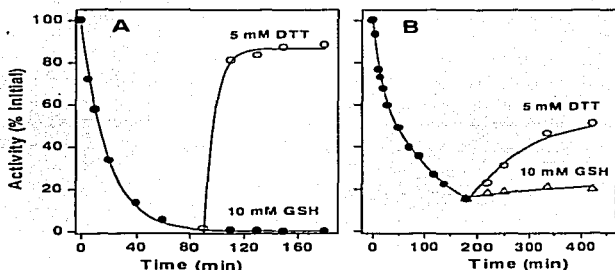


Fig. 5. Reactivation by 5 mM DTT (\circ) and 10 mM GSH (Δ) of (A) *P. aeruginosa* BADH inactivated by 50 μ M DSF in the presence of 0.3 mM NADP⁺; (B) amaranth BADH inactivated by 50 μ M DSF in the presence of 0.2 mM betaine aldehyde. Other conditions were as in Figs. 1 and 2. The lines are the best fit of the inactivation and reactivation data to the equations for single exponential decay or growth, respectively, by nonlinear regression.

substrates [31] and a random one at high concentrations [32] and so it is most likely that under our experimental conditions, betaine aldehyde binds to the free enzyme non productively, i.e. not interacting with the essential cysteine to form the reaction intermediate thiohemiacetal. Second, even if this were the case, binding of betaine aldehyde to the substrate subsite should sterically protect the essential Cys against modification and then decrease the rate of inactivation. Amaranth BADH has a cysteine residue, Cys453, in its substrate binding pocket, in addition to the essential Cys294. In the absence of the nucleotide, betaine aldehyde would either promote DSF modification of Cys453, which would in turn cause enzyme inactivation by blocking the access to the active site, or interact with Cys453 exposing at the same time the essential thiolate of Cys 294. However, the proximity of these Cys residues and the orientation of the sulfur of Cys294 towards the substrate binding subsite, suggest that betaine aldehyde would sterically protect both thiolates, should it bind to the substrate pocket. There is also the possibility that, in the absence of coenzyme, betaine aldehyde binds

nonproductively to the coenzyme subsite, thus permitting chemical modification of one or both active site Cys residues. When both betaine aldehyde and NADH are present in the incubation medium, the rate constant of the first phase is increased with respect to that found for the free enzyme but much less than in the binary complexes with NADH or betaine aldehyde. This result suggests that if the coenzyme is present, betaine aldehyde binds to the aldehyde subsite, affording some protection against inactivation. It has to be noticed that the aldehyde concentrations used in these experiments are more likely not saturating, either for the binding of betaine aldehyde to the free enzyme or for its binding to the apoenzyme and therefore we could not observe the maximum betaine aldehyde effects.

3.3. Enzyme reactivation by DTT and glutathione

Treatment of DSF-inactivated *P. aeruginosa* and amaranth BADHs with 5 mM DTT resulted in 90 and 50% recovery of enzyme activity after 90 and 240 min of incubation with the reductant, respectively (Fig. 5). Reactivation of the amaranth

enzyme, as inactivation, is much slower than that of the *P. aeruginosa*. Incubation with 10 mM reduced glutathione (GSH) could not appreciably reactivate the enzymes, particularly the bacterial one, which remained inactive after 90 min of incubation with the reductant. A similar failure of GSH to reactivate other DSI-inactivated ALDH has been previously reported [33] and although the reason for this failure is not clear as yet, it might be related to the inability of the bulky GSH to reach and reduce the disulfide bridge of the DSI-inactivated enzyme. The lack of reversibility by GSH of the DSE-mediated inactivation of *P. aeruginosa* BADH is another important finding which encourages further studies with this inhibitor and its metabolites as potential antimicrobial agents.

Acknowledgements

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT Grant 37820N).

References

- [1] B.R. Bennek, Renal tubule transport of organic ions, *Am. J. Physiol.* 240 (1981) F83–F89.
- [2] S.R. Pesin, O.A. Candia, Acetylcholine concentration and its role in ionic transport by the corneal epithelium, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22 (1982) 651–659.
- [3] J.R. Wright, J.A. Clements, Metabolism and turnover of lung surfactant, *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 (1987) 426–444.
- [4] T. Nagasawa, Y. Kawabata, Y. Tam, K. Ogata, Purification and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Pro-16, Agr. Biol. Chem.* 40 (1976) 1743–1749.
- [5] I.S. Csonka, A.D. Hanson, Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology, *Ann. Rev. Microbiol.* 45 (1991) 509–606.
- [6] D. Rhodes, A.D. Hanson, Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 (1993) 357–384.
- [7] H. Kibbinné, Bacterial content and ionic composition of sputum in cystic fibrosis, *Lancet* 1 (1978) 334.
- [8] M.R. D'Souza-Ault, L.T. Smith, G.M. Smith, Roles of *N*-acetylglutaminyl-glutamine amide and glycine betaine in adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to osmotic stress, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 473–478.
- [9] T.A. Lisa, C.H. Casale, C.E. Domenech, Cholinesterase, acid phosphatase, and phospholipase C of *Pseudomonas aeruginosa* under hyperosmotic conditions in a high-phosphate medium, *Curr. Microbiol.* 28 (1994) 71–76.
- [10] V.D. Shorridge, A. Lazduski, M.E. Vasil, Osmoprotectants and phosphate regulate expression of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* 6 (1992) 863–871.
- [11] A.E. Sage, A.I. Vasil, M.E. Vasil, Molecular characterization of mutants affected in the osmoprotectant-dependent induction of phospholipase C in *Pseudomonas aeruginosa*, *Mol. Microbiol.* 23 (1997) 43–56.
- [12] T. Kitson, The disulfiram-ethanol reaction: A review, *J. Stud. Alcohol* 202 (1977) 96–113.
- [13] H.W. Hart, M.D. Lomen, Bioactivation of *N*-methyl-*N*,*N*-diethylthiocarbamate to *S*-methyl-*N*,*N*-diethylthiocarbamate sulfoxide, *Biochem. Pharmacol.* 46 (1993) 2285–2290.
- [14] R.A. Deitch, V.G. Liwin, Mechanism of the inhibition of aldehyde dehydrogenase in vivo by disulfiram and diethylthiocarbamate, *Mol. Pharmacol.* 7 (1971) 301–307.
- [15] T.M. Kitson, Studies on the interaction between disulfiram and sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase, *Biochem. J.* 175 (1978) 83–90.
- [16] M.K. Chen, R. Pietraszek, Human aldehyde dehydrogenase E3 isozyme is a betaine aldehyde dehydrogenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213 (1995) 561–568.
- [17] G. Kury, W. Ambioziak, R. Pietraszek, Human aldehyde dehydrogenase, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 4715–4721.
- [18] E. Valenzuela-Soto, R. Velasco-García, C. Munca-Jiménez, L. Gavira-González, R.A. Muñoz-Clares, Mutational alterations requirements for the stability of betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, porcine kidneys and amaranth leaves, *Chem.-Biol. Interact.* (2003) this special issue.
- [19] R. Velasco-García, C. Munca-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.
- [20] R. Velasco-García, L. González-Segura, R. Muñoz-Clares, Steady-state kinetic mechanism of N^2,N^1,N^1 - and N^2,N^1,N^2 -dependent reactions catalyzed by betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochem. J.* 352 (2000) 675–683.
- [21] 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.
- [22] H.S. Penick, Reversible binding of *P*, by beef heart mitochondrial adenosine triphosphatase, *J. Biol. Chem.* 252 (1977) 2891–2899.
- [23] R.A. Muñoz-Clares, L. González-Segura, C. Munca-Jiménez, L. Contreras-Díaz, 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.* (2003) this special issue.
- [24] G. Mylre, B.N.I. Floyd, D.C. Mays, D.W. Macomber, J.J. Lipsky, Selectivity of disulfiram and its metabolites for human mitochondrial aldehyde dehydrogenase, *FASEB J.* 15 (2001) A919–A919.
- [25] J.J. Lipsky, M.L. Shen, S. Naylon, Overview in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites, *Chem.-Biol. Interact.* 130–132 (2001) 81–91.
- [26] L. González-Segura, R. Velasco-García, E. Rudiño-Piñera, R.A. Muñoz-Clares, Analysis by chemical modification and site-directed mutagenesis of the role of nonessential cysteines in betaine aldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa* (submitted for publication).
- [27] K. Johansson, M. El-Agnaf, S. Ramaswamy, L. Hjeltnes, H. Jonvall, H. Ekland, Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution, *Prot. Sci.* 7 (1998) 2106–2117.
- [28] 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.
- [29] P.K. Hannen, A. Allali-Hassani, K. Hallenga, T.D. Hurley, H. Weimer, Multiple conformations of NAD and NADH when bound to human cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenase, *Biochemistry* 41 (2002) 7156–7168.
- [30] D.C. Mays, A.N. Nelson, J.P. Lam-Holt, A.H. Lau, J.J. Lipsky, *N*-Methyl-*N*-*N*-ethylthiocarbamate sulfone two candidates for the active metal-binding of disulfiram, *Alcohol Clin. Exp. Res.* 20 (1996) 595–600.
- [31] 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) 23815–23824 (additions and corrections, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 4602).
- [32] M. Votavchova, R. Rodriguez-Sotres, E.M. Valenzuela-Soto, R.A. Muñoz-Clares, Substrate inhibition by betaine aldehyde of *Amaranthus hypochondriacus* L., *Biochim. Biophys. Acta* 1341 (1997) 49–57.
- [33] R. Vallari, R. Pietruszko, Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition by disulfiram, *Science* 216 (1982) 637–639.